

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Michael Stöckle

Ein neuartiges Zellkulturmodell des high risk Prostatakarzinoms

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Moritz Kohn

geb. am 03.05.1985 in Freiburg im Breisgau

Tag der Promotion: 28.07.2020
Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger
Berichterstatter: Prof. K. Junker
Prof. St. Stilgenbauer

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| 1 Zusammenfassung/Summary | 7 |
| 2 Einleitung | 9 |
| 2.1 Das Prostatakarzinom | 9 |
| 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie | 9 |
| 2.1.2 Früherkennung und Diagnostik | 10 |
| 2.1.3 Therapie | 11 |
| 2.2 Limitationen der aktuellen Diagnostik und Therapie | 12 |
| 2.3 In vitro Modelle des Prostatakarzinoms | 13 |
| 2.4 Eigenschaften der Sphäroidkultur als präklinisches Tumormodell des Prostatakarzinoms | 15 |
| 2.5 Zielsetzung | 17 |
| 3 Material und Methodik | 18 |
| 3.1 Material | 18 |
| 3.1.1 Permanente Zelllinien | 18 |
| 3.1.2 Primärkulturgewebe | 18 |
| 3.1.3 Zellkulturmedien und Reagenzien für permanente Zelllinien und Primärkulturen | 19 |
| 3.1.4 Zellkultur Verbrauchsmaterialien | 20 |
| 3.1.5 Chemikalien | 21 |
| 3.1.6 Lösungen | 22 |
| 3.1.7 Geräte | 23 |
| 3.1.8 Primär- und Sekundärantikörper für die Immunzytochemie | 24 |
| 3.2 Methodik | 25 |
| 3.2.1 Kultivierung der permanenten Zelllinien | 25 |
| 3.2.2 Passagierung der permanenten Zellen | 25 |
| 3.2.3 Zellzählung | 25 |
| 3.2.4 Kultivierung von Sphäroiden aus LNCaP Zellen | 26 |
| 3.2.5 Vereinzelung der LNCaP Sphäroide | 26 |
| 3.2.6 Gewinnung des Prostatagewebes im Rahmen der radikalen Prostatektomie | 26 |
| 3.2.7 Prozessierung und Kultivierung des primären Prostatakarzinomgewebes | 26 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.8 | Medienwechsel der Primärkultur | 30 |
| 3.2.9 | Passagierung der Primärkultur | 30 |
| 3.2.10 | Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Zellviabilität der Primärkultur..... | 30 |
| 3.2.11 | Fixierung der Primärkultur auf Objektträger..... | 31 |
| 3.2.12 | Auftropfen einer Zellsuspension auf Objektträger..... | 31 |
| 3.2.13 | Aufspinnen einer Zellsuspension auf Objektträger mittels Zytocentrifuge | 31 |
| 3.2.14 | Immunzytochemische Färbungen des Primärmaterials..... | 32 |
| 3.2.15 | Suspensionsfärbung..... | 32 |
| 3.2.16 | Fixierung und Einbettung von Sphäroiden in Paraffinblöcke | 33 |
| 3.2.17 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Sphäroide..... | 33 |
| 3.2.18 | CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) | 33 |
| 4 | Ergebnisse | 35 |
| 4.1 | Vorversuche..... | 35 |
| 4.2 | Prozessierung des primären Prostatagewebes..... | 36 |
| 4.3 | Kultivierung des primären Prostatagewebes..... | 39 |
| 4.4 | Hämatoxylin Eosin Färbung der Primärkultur..... | 41 |
| 4.5 | LIVE/DEAD® Cell Viability Assays zum Nachweis der Zellviabilität der Sphäroide | 41 |
| 4.6 | Immunzytochemische Färbung von Einzelzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie | 43 |
| 4.6.1 | Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten aus LNCaP Sphäroiden..... | 46 |
| 4.6.2 | Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten aus primären Sphäroiden | 47 |
| 4.7 | CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)..... | 49 |
| 5 | Diskussion | 51 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 62 |
| 7 | Publikationen..... | 68 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| 2D | Zweidimensional |
| 3D | Dreidimensional |
| AMACR | Alpha-Methylacyl-CoA Racemase |
| AR | Androgenrezeptor |
| BCR - ABL | Breakpoint Cluster Region - Abelson Murine Leukemia |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CT | Computertomographie |
| CK | Cytokeratin |
| DAPI | Diamidino-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| DRU | Digitale rektale Untersuchung |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ERSPC | European randomized study of screening for prostate cancer |
| FCS | Fetal calf serum |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LDH+ | Cytotoxicity Detection Kit(Plus) |
| miRNA | Micro-RNA |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| PET | Positronenemissionstomographie |
| PSA | Prostata-spezifisches Antigen |
| fPSA | Freies PSA |
| Rho | Ras homologue, kleines G-Protein |

| | |
|--------|--|
| RNA | Ribonucleid acid |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT-PCR | Reverse trancription polymerase chain reaction |
| siRNA | Small interfering-RNA |
| TNM | Tumor node metastasis |
| TRUS | Transrektaler Ultraschall |

1 Zusammenfassung/Summary

Das Prostatakarzinom steht an erster Stelle der malignen Erkrankungen des Mannes. Es tritt vorwiegend im hohen Lebensalter auf und ist durch eine hohe Morbidität und Mortalität gekennzeichnet. Vor dem Hintergrund einer alternden Gesellschaft wird die Relevanz dieser Erkrankung in Zukunft weiter zunehmen.

Die verfügbaren diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt, da die Biologie dieser Erkrankung noch unzureichend verstanden ist. Dies hängt insbesondere mit dem Fehlen geeigneter präklinischer Modelle in der Prostatakarzinomforschung zusammen. Die in vitro Kultivierung sowohl lokal begrenzter als auch metastasierter Tumorstadien hat sich über die letzten Jahrzehnte hinweg als ausgesprochen schwierig erwiesen. Viele Eigenschaften des Prostatakarzinoms stehen einer in vitro Kultivierung entgegen. Hierzu gehört das nur sehr limitierte Tumorgewebe, welches pro Patient für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt werden kann, sowie das vergleichsweise langsame Zellwachstum. Zudem benötigen die Zellen sehr spezielle Umgebungsbedingungen, die bisher noch unzureichend erforscht wurden. Sowohl aus diagnostischen, therapeutischen wie auch gesundheitsökonomischen Gesichtspunkten wäre es von großer Bedeutung, humane Primärtumore in vitro zu kultivieren und die Progression zu fortgeschrittenen Tumorstadien nachzuvollziehen.

Unter Berücksichtigung neuer Ansätze der in vitro Forschung aus anderen Tumorentitäten sowie der embryonalen Stammzellforschung konnte aus seriell transplantierten Mausxenografts der LuCaP Reihe ein neuartiges Zellkulturmodell entwickelt werden, bei dem es gelungen ist, das Zellmaterial über mehrere Passagen hinweg in Zellkultur zu halten. Die Innovationen, die dabei zum Erfolg führten, waren zum einen die permanente Beibehaltung von Zell-Zell Kontakten sowie die Zugabe sogenannter small molecules (Y27632), welche die Zell-Zell Interaktionen verstärken.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein an Xenograftmodellen metastasierter Tumorproben etabliertes Modell auf direkt nach OP gewonnenes Patientenmaterial übertragen.

Das Zellmaterial wurde aus Prostataresektaten nach radikaler Prostatektomie sowie in einem Fall durch palliative TUR-P gewonnen und nach limitiertem Verdau als Sphäroidsuspensionskultur kultiviert. So konnten die entstandenen Sphäroide über mehrere Monate hinweg in Kultur gehalten werden.

Die Morphologie der Sphäroide wurde lichtmikroskopisch und histologisch untersucht. Anschließend wurde mittels LIVE/DEAD® Cell Viability Assays die Viabilität des Zellmaterials zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung nachgewiesen. Eine Charakterisierung des Zellmaterials erfolgte durch immunzytochemische und immunhistochemische Verfahren. Dabei konzentrierten wir uns auf den Nachweis der Cytokeratine CK-5 und CK-8 sowie des Androgenrezeptors und des Proliferationsmarkers Ki67. Die genannten Oberflächenmerkmale konnten in unserer Kultur in unterschiedlich starker Expressierung nachgewiesen werden. Schließlich wurde mittels CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) die Proliferationsfähigkeit des Zellmaterials über einen Beobachtungszeitraum von vier Tagen nachgewiesen.

Unter Berücksichtigung der spezifischen Eigenschaften des Prostatagewebes ist es gelungen, ein primäres 3-dimensionales in vitro Sphäroid-Modell neu zu etablieren, welches auch über die vorliegende Arbeit hinaus weiterentwickelt wird. Es können dadurch neue experimentelle Forschungsansätze verfolgt werden.

Summary

A Novel Cell Culture Model for high risk Prostate Cancer

Prostate cancer is the most frequent malignant tumor in men. It occurs mostly in older men, with a high morbidity and mortality. Against the background of an aging society the relevance of this disease will increase in the future. The currently available diagnostic and therapeutic options are limited because the biology of this disease is not fully understood. This is particularly related to a lack of suitable preclinical models for prostate cancer that can mimic primary prostate cancer. In vitro culturing of localized as well as metastasized prostate cancer cells has been particularly challenging. Many characteristics of prostate cancer impede in vitro culturing. There is on the one hand a very small amount of tumor tissue that can be asservated from each patient, on the other hand prostate cancer cells are growing very slowly. Furthermore, prostate cells require very specific environmental conditions that have not yet been entirely understood. The possibility of a reliable cultivation of prostate cancer would be an important step in a better understanding of prostate cancer biology. This could help to find better diagnostic and therapeutic options and also reduce costs in health economy. By considering new in vitro research of other tumor entities, such as findings in stem cell research, a novel in vitro model for LuCaP Xenografts has been successfully established by Peehl et al. They could demonstrate a cell viability of LuCaP Xenografts over several passages. Innovations that have been contributed to this success were a continual maintenance of cell-cell contacts as well as the adding of so called small molecules such as the Rock-Inhibitor Y-27632, which enhances cell-cell contacts. In the present work we attempted to transfer the successful in vitro model of LuCaP Xenografts to primary prostate cancer tissue. Cancer tissue was asservated by radical prostatectomy. We proceeded the tissue by limited digestion and cultivated it as three dimensional spheroids. We could demonstrate viability of the spheroid cells over several months. Morphology was observed and documented by microscopy and histological examination. Cell viability was tested by LIVE/DEAD® Cell Viability Assays. To characterize the cell material we performed immunocyto- and immunohistochemistry. We used the markers CK-5, CK-8, Androgenreceptor and Ki67. They all could be found in different concentrations. Finally, we performed CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) to demonstrate cell proliferation. By an observation period of 4 days, we could demonstrate cell proliferation. By integrating the innovations mentioned above we established a novel three dimensional spheroid culture model that is applied and developed constantly. This enables new approaches in prostate cancer research.

2 Einleitung

2.1 Das Prostatakarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Prostatakarzinom stellt in einer alternden Gesellschaft eine zunehmende Herausforderung dar. 2018 wurde für das Prostatakarzinom in den USA eine Neuerkrankungsrate von 164.690 Männern prognostiziert, 29.430 Sterbefälle wurden dem Prostatakarzinom zugeordnet. Damit steht das Prostatakarzinom mit 11,3% an zweiter Stelle der tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen bei Männern. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren (Smith et al., 2018).

Ein steigendes Lebensalter wird als wichtigster gesicherter Risikofaktor für die Entstehung des Prostatakarzinoms angesehen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018), gleichzeitig ist das Prostatakarzinom die am häufigsten auftretende maligne Erkrankung bei Männern (Ellem, De-Juan-Pardo, & Risbridger, 2014; Gao et al., 2014; Mottet et al., 2017). Der Anteil der über 60-jährigen Männer in unserer Bevölkerung wird sich voraussichtlich bis zum Jahr 2050 auf 28 Millionen Männer verdoppeln (Beske, 2007). Analog dazu wird auch die Zahl der Prostatakarzinome steigen. Ein weiterer gesicherter Risikofaktor ist eine positive Familienanamnese. Kontrovers diskutiert werden Risikofaktoren wie Ernährung, Adipositas, Rauchen und Alkohol, sowie die chronische Prostatitis. Es gibt keine Evidenz, welche einen eindeutigen Einfluss dieser Faktoren für die Entstehung oder das Fortschreiten des Prostatakarzinoms belegt (Tao, Shi, Wang, & Zhang, 2015). Androgene spielen bei der Tumorentstehung eine Rolle, da in permanenter Abwesenheit von Testosteron praktisch keine Prostatakarzinome entstehen. So kann das Prostatakarzinom bei Eunuchen nicht nachgewiesen werden. Die Höhe des Testosteronspiegels konnte jedoch nicht mit der Entstehung des Prostatakarzinoms korreliert werden (Scovell, Butler, Ramasamy, & Lamb, 2015).

Die altersstandardisierte Inzidenz des Prostatakarzinoms variiert weltweit. So ist die Inzidenz bei afroamerikanischen Männern mit 185,4/100.000 am höchsten. In Europa besteht ein Nord-Süd-Gefälle: Für Schweden werden Inzidenzzahlen von 90,9/100.000, für Spanien von 35,9/100.000 angegeben. Gleichzeitig ist eine starke Altersabhängigkeit der Inzidenz zu beobachten. Sie liegt bei den 30 bis 34-jährigen bei 1/100.000, bei den 65-69-jährigen hingegen bei 58/100.000 (Haas, Delongchamps, Brawley, Wang, & de la Roza, 2008; M. C. Wong et al., 2018).

Die bisherigen Erkenntnisse über die Tumorentstehung und das Fortschreiten dieser Erkrankung sind dürftig (Ellem et al., 2014). Vor diesem Hintergrund wird die Bedeutung des Prostatakarzinoms für Forschung, Diagnostik und Therapie deutlich (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018).

2.1.2 Früherkennung und Diagnostik

Zu den Früherkennungsuntersuchungen des Prostatakarzinoms gehören die Anamnese sowie die digital rektale Untersuchung. Das PSA Screening wird als Vorsorgeuntersuchung angewendet, ist in seiner Aussagekraft und seinem Nutzen jedoch umstritten. Die karzinomspezifische Mortalität kann durch ein PSA Screening zwar gesenkt werden (Lindberg et al., 2019; Schröder et al., 2012), das Screening birgt jedoch die Gefahr einer Überdiagnostik und Übertherapie, da auch Prostatakarzinome entdeckt und in der Folge therapiert werden, welche nicht symptomatisch geworden wären und keinen Einfluss auf die Mortalität gehabt hätten (Draisma et al., 2009; Heijnsdijk et al., 2009). Dies wird daran deutlich, dass Komorbiditäten in allen Altersgruppen anteilmäßig einen stärkeren Einfluss auf das Überleben haben, als das Prostatakarzinom selbst (Albertsen, Hanley, & Fine, 2005). Die ERSPC-Studie hat nach 16-jährigem follow-up ergeben, dass 570 PSA Screenings durchgeführt sowie 18 Diagnosen eines Prostatakarzinoms erbracht werden müssen, um einen Tod zu verhindern (Hugosson et al., 2019). Eine Verbesserung der Sensitivität und Spezifität des PSA-Wertes kann durch Berücksichtigung altersabhängiger PSA-Grenzwerte (Oesterling et al., 1993), der Bestimmung der PSA-Dichte, der Konzentration von freiem PSA (fPSA) sowie des PSA-Verlaufs erreicht werden. (Carter et al., 1992; Catalona, Beiser, & Smith, 1997).

Ergibt sich im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen der Verdacht auf das Vorliegen eines Prostatakarzinoms, schließen sich eine transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS) mit Biopsieentnahme sowie ggf. eine Magnetresonanztomographie an (Labanaris, Engelhard, Zugor, Nützel, & Kühn, 2010). Neuere bioptische Verfahren sind die MRT-navigierte stereotaktische Prostatabiopsie sowie die MRT-Ultraschall-Fusionsbiopsie. Diese Verfahren ermöglichen eine verbesserte Detektionsrate relevanter Tumoren, insbesondere bei Patienten mit negativen konventionellen Biopsien und weiterhin erhöhten oder progredienten PSA Werten (Cash et al., 2016).

Weitere bildgebende diagnostische Verfahren im derzeit experimentellen Stadium sind u.a. die Positronenemissionstomographie (PET) in Kombination mit einem CT oder MRT (Afshar-Oromieh et al., 2014), die MRT mit magnetischen Nanopartikeln (Harisinghani et al., 2003) sowie die Ultraschallelastographie (Brock et al., 2012).

Neue Biomarker sollen helfen, das PSA Screening zu verbessern bzw. eine Unterscheidung von low, intermediate und high-risk-Karzinomen zu ermöglichen. Hierzu gehören beispielsweise das PCA3 und [-2]proPSA (Schmid et al., 2014). Jedoch sind multizentrische Studien notwendig, damit diese neueren Biomarker in den Leitlinien Berücksichtigung finden.

Bei deutlich erhöhten PSA Werten ($>20\text{ng/ml}$) oder einem Gleason Wert ≥ 8 sollte vor kurativer Therapieplanung ein Staging erfolgen. Die Skelettszintigraphie ermöglicht die Erfassung von Knochenmetastasen. Die Sensitivität dieser Untersuchung ist hoch, die Spezifität jedoch eher gering. Für die Beurteilung der lokalen Tumorausbreitung kann die Magnetresonanztomographie angewendet werden, deren Aussagekraft höher ist als die transrektale Ultraschalluntersuchung.

Kleine Lymphknotenmetastasen können nur operativ durch pelvine Lymphadenektomie und anschließende pathologische Untersuchung sicher detektiert werden. Eine Indikation hierfür besteht bei Patienten mit erhöhtem Risiko für Lymphknotenmetastasen. (Lawrentschuk & Fleshner, 2009; Wawroschek et al., 2003).

2.1.3 Therapie

Die Wahl einer geeigneten Therapie erfordert insbesondere beim Prostatakarzinom eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Abwägung, da kaum eine andere Tumorentität eine derart große Heterogenität der klinischen Erscheinungsformen, von insignifikanten, sehr langsam wachsenden Tumoren bis hin zu hoch aggressiven, frühzeitig metastasierenden Tumoren aufweist. Auch besteht die Möglichkeit, dass ein zunächst als indolent eingestuftes Karzinom in ein Hoch-Risiko-Karzinom übergeht. Die Herausforderung besteht darin, die verschiedenen Erscheinungsformen voneinander zu unterscheiden (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Thompson, Ankerst, Etzioni, & Wang, 2008). Leider sind die derzeit in der klinischen Routine berücksichtigten diagnostischen Faktoren (Tumoranteile in den Biopsien, Gleason-Grading, PSA, Staging) nur begrenzt geeignet, eine exakte Empfehlung über die notwendige Aggressivität oder auch Zurückhaltung im therapeutischen Vorgehen zu treffen.

Die Wahl der therapeutischen Strategie richtet sich in erster Linie nach dem Risikostadium des Karzinoms (high risk/low risk) und dem Tumorstadium bei Diagnosestellung. Dies muss in Zusammenschau mit dem Alter des Patienten, dessen Komorbiditäten und der entsprechenden Lebenserwartung interpretiert werden. Selbstverständlich spielen die persönlichen Bedürfnisse und Erwartungen des Patienten bei der Wahl des therapeutischen Vorgehens eine entscheidende Rolle.

Zu den kurativen Therapieansätzen des lokal begrenzten Prostatakarzinoms gehören die Operation als offene, laparoskopische oder roboter-assistierte radikale Prostatektomie, ggf. mit pelviner Lymphadenektomie, die perkutane Radiotherapie, die Brachytherapie oder die Active surveillance bei Niedrig-Risiko-Prostatakarzinomen. Bei der Active surveillance werden in regelmäßigen Abständen PSA Kontrollen und Kontrollbiopsien durchgeführt. Sollte sich dabei eine Tumorprogredienz ergeben, kann eine definitive Therapie eingeleitet werden (Kinsella et al., 2018). Bisher konnte keinem der o.g. kurativen Therapieansätze eine eindeutige Überlegenheit zugeschrieben werden. Bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen wird in der Regel eine hormonablativ/antiandrogene Therapie eingeleitet, welche bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Prostatakarzinomen, ausgeprägtem Lymphknotenbefall nach radikaler Prostatektomie oder neoadjuvant/adjuvant zur Radiotherapie Anwendung findet (Sydes et al., 2018). Die antiandrogene Therapie kann entweder durch subkapsuläre Orchiektomie oder durch medikamentöse Androgendeprivation erfolgen. Bei der medikamentösen Variante kommen nichtsteroidale Androgenrezeptorantagonisten sowie GnRH-Analoga und Antagonisten zum Einsatz. Bei Tumorprogress unter dieser Therapie können zusätzlich Androgenrezeptorantagonisten als maximale Androgenblockade hinzugegeben werden (Beer et al., 2014). Seit 2015 ist für die meisten Patienten auch eine Kombinationstherapie mittels Chemotherapie oder sekundärer Hormontherapie vorzusehen (Fizazi et al., 2017; Sweeney et al., 2015).

Kommt es unter Androgenablation zum PSA Anstieg oder Krankheitsprogress, spricht man von einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom. In diesem Stadium kann eine Chemotherapie unter Fortsetzung der antiandrogenen Therapie erfolgen. Chemotherapeutika sind Docetaxel, Mitoxantron oder Cabacitaxel, welche in Kombination mit Prednison eingesetzt werden können (Berthold et al., 2008; de Bono et al., 2010). Weitere Medikamente welche im Stadium des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms vor oder nach Chemotherapie eingesetzt werden, sind der CYP-17 Inhibitor Abirateron sowie der Androgenrezeptorantagonist Enzalutamid. Durch Einsatz dieser Medikamente konnte eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens gezeigt werden. (Beer et al., 2014; Cabot et al., 2012; Ryan et al., 2013). Die Tatsache, dass Androgenrezeptorantagonisten sowie Hemmer der Testosteronbiosynthese ein Ansprechen beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom zeigen, verdeutlicht die Rolle des Androgenrezeptors in diesem Krankheitsstadium (Miller, 2011).

Zur Senkung der Morbidität kastrationsresistenter Patienten durch ossäre Metastasen kommen Bisphosphonate wie Zoledronsäure zum Einsatz (Saad et al., 2004). Ebenfalls vorbeugend für Komplikationen durch Knochenmetastasen ist der monoklonale Antikörper Denosumab. Diese Medikamente wirken durch Hemmung der Osteoklastenfunktion, können jedoch Kieferosteonekrosen als schwere Nebenwirkung hervorrufen (Fizazi et al., 2011). Symptomatische Knochenmetastasen können durch palliative perkutane Radiotherapie behandelt werden.

2.2 Limitationen der aktuellen Diagnostik und Therapie

In der heutigen klinischen Routine wird die Einschätzung der Malignität eines Prostatakarzinoms präoperativ anhand einiger wichtiger Parameter getroffen. Hierzu zählen der PSA-Wert, der Gleason-Score, das Prostatavolumen, das Patientenalter bei Diagnosestellung, das klinische Stadium anhand des digital-rektalen Tastbefundes sowie der prozentuale Anteil positiver Stanzungen (Chun et al., 2007; Epstein, Allsbrook Jr, Amin, Egevad, & Committee, 2005). Der Gleason-Score, gemeinsam mit dem Staging und dem PSA-Wert bei Diagnosestellung sind derzeit die wichtigsten Prognosekriterien für das Prostatakarzinom (Gleason, Mellinger, & Group, 2002). Anhand des Gleason-Scores sowie der o.g. Kriterien werden die Patienten in Risikogruppen eingeteilt, wodurch eine Einschätzung über die erforderliche Aggressivität des therapeutischen Vorgehens getroffen wird. Unterschiede innerhalb der Risikogruppen, beispielsweise in Bezug auf ein individuelles, spezifisches Ansprechen bestimmter Therapeutika im Sinne einer personalisierten Medizin, finden dabei noch keine Berücksichtigung. Auch orientiert sich das Design klinischer Studien in Bezug auf die Beobachtungsgruppen häufig anhand der Gleason-Einteilung. Molekulare Unterschiede der Tumoren werden auf diese Weise nicht berücksichtigt (Logothetis et al., 2013). Die ausgesprochene Heterogenität der Prostatakarzinome zeigt jedoch, dass spezifische Charakteristika der jeweiligen Tumore gefunden und berücksichtigt werden müssten, um ein noch individualisierteres Patientenmanagement zu gewährleisten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass einige Genomalterationen prognostische Bedeutung besitzen (B. S. Taylor et al., 2010).

Durch Berücksichtigung der individuellen Biologie verschiedener Tumore könnte im Rahmen der Früherkennung bzw. in frühen Krankheitsstadien eine Übertherapie und die damit verbundenen Komplikationen und Beeinträchtigungen der Lebensqualität bei Patienten mit indolenten Prostatakarzinomen vermieden werden. Bei Hoch-Risiko-Karzinomen hingegen könnte durch Kenntnis prädiktiver Marker eine radikalere Therapieform gewählt und das Ansprechen spezifischer Therapeutika besser abgeschätzt werden, wodurch eine individuell geeignete Therapie angeboten werden kann (Barbieri et al., 2013; Korzeniewski et al., 2013).

Die molekularen Mechanismen der Entstehung und des Voranschreitens des Prostatakarzinoms, insbesondere dem Übergang vom hormonabhängigen zum kastrationsresistenten Prostatakarzinom sind Gegenstand intensiver Forschung. Die Mechanismen sind jedoch bisher nur unzureichend verstanden (Ellem et al., 2014). Technische Weiterentwicklungen wie beispielsweise die „next generation sequencing“ Methode (NGS) haben die Analyse genetischer Alterationen durch genomweite Sequenzierungsuntersuchungen deutlich vereinfacht und kosteneffizienter gemacht. Seitdem sind Erkenntnisse über molekulare Aberrationen, welche mit dem Prostatakarzinom in Verbindung gebracht werden können, rasant angestiegen. Die gewonnenen Daten verdeutlichen eindrucksvoll die enorme Heterogenität sowie die genomische Instabilität, welche charakteristisch für das Prostatakarzinom ist (Berger et al., 2011; B. S. Taylor et al., 2010). Zu den prostatakarzinom-spezifischen genetischen Defekten gehören u.a. ETS Fusionsgene, SPOP und BRCA Mutationen und in metastasierten Stadien Mutationen im Bereich der Signaltransduktion des Androgenrezeptors (Grasso et al., 2012).

2.3 In vitro Modelle des Prostatakarzinoms

In vitro Modelle können wertvolle Erkenntnisse über die zugrundeliegende Biologie, aber auch die Dynamik von Karzinomen liefern. Darüber hinaus ist es möglich, die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber therapeutischen Interventionen zu untersuchen. Funktionsfähige präklinische Tumormodelle sollten leicht verfügbar, expansionsfähig und kosteneffizient sein.

Leider stehen in vitro Modelle für das Prostatakarzinom bisher nur sehr begrenzt zur Verfügung. Es ist daher von großer Bedeutung, Fortschritte in der präklinischen Forschung für das Prostatakarzinom zu erzielen.

Die Beobachtungen am in vitro Modell sind nur dann aussagekräftig und auf den Primärtumor übertragbar, wenn das Modell die Heterogenität und Komplexität des Prostatakarzinoms abbilden kann (Nunes, Barros, Costa, Moreira, & Correia, 2019). Dadurch können Genamplifikationen, „Crosstalks“ verschiedener Signalwege sowie Androgenrezeptorvarianten, welche für Prostatakarzinome bereits beschrieben wurden, in ihrer Rolle aber noch unzureichend verstanden sind, systematisch beforscht werden und deren Bedeutung in der Krankheitsentstehung und Progression analysiert werden. Teure und aufwändige klinische Forschung kann mittels in vitro Modellen ergänzt und bereichert werden (Ellem et al., 2014).

Bei anderen Tumorerkrankungen konnten bedeutende Mechanismen der Tumorgenese sowie Erkenntnisse

über das Ansprechen von Medikamenten, aber auch Resistenzentwicklungen anhand aussagekräftiger in vitro Modelle und Xenograft Modelle gewonnen werden (Solit et al., 2006; Whittle, Lewis, Lindeman, & Visvader, 2015). Als Beispiel sei die Entdeckung des bcr-abl Onkogens als Tumorpromotor bei der chronisch myeloischen Leukämie sowie dessen erfolgreiche Inhibierung durch den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib genannt (Druker et al., 1996; Wood, Savage, & Antman, 2002).

Die Prostatakarzinom-Forschung war lange durch ein Mangel geeigneter präklinischer Tumormodelle gekennzeichnet (Pienta et al., 2008). Auch in den letzten Jahren konnten nur wenige Tumormodelle für das Prostatakarzinom entwickelt werden. Karzinomzelllinien des primären Prostatakarzinoms existieren derzeit nicht. Nur 7 von etwa 1000 in der Literatur beschriebenen Tumorzelllinien können dem Prostatakarzinom zugeordnet werden (Horoszewicz et al., 1983; Kaighn, Lechner, Narayan, & Jones, 1978; Korenchuk et al., 2001; Mertz et al., 2007; Navone et al., 1997). Zu den zuverlässig verfügbaren permanenten Zelllinien, an denen der Großteil der präklinischen in vitro Forschung durchgeführt wurde, gehören die aus Tumormetastasen gewonnenen Zelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3 (Cunningham & You, 2015). DU-145 und PC-3 exprimieren weder einen Androgenrezeptor, noch PSA (mRNA/Protein), während LNCaP eine mutierte Variante eines Androgenrezeptors exprimiert. Meist werden diese Zelllinien als 2-dimensionale Monokulturen kultiviert.

Auch wenn diese genannten Zellkultursysteme einen immensen Beitrag für das Verständnis des Prostatakarzinoms geliefert haben, sind die Ergebnisse aus einer Reihe von Gründen nur bedingt auf primäre Prostatakarzinome übertragbar. Durch die Gewinnung aus Metastasen und die häufige Passagierung, welche zu genomischen Veränderungen und Änderungen der Wachstumsrate und Proteinsynthese führt, sind die Modelle nur bedingt mit dem lokalisierten Prostatakarzinom vergleichbar (Ellem et al., 2014; Esquenet, Swinnen, Heyns, & Verhoeven, 1997). Sie können das primäre Adenokarzinom der Prostata somit nur unzureichend skizzieren (Peehl, 2005). Genomische Vergleiche zwischen permanenten Zelllinien und den Tumoren, aus denen sie ursprünglich stammen, haben ergeben, dass eine große Diskrepanz besteht. Beispielsweise ist die Zelllinie PC-3 in ihrer Genetik näher mit malignen Melanomen oder Lungenkarzinomen verwandt, als mit dem Prostatakarzinom (Wang et al., 2006). Die Expression typischer prostataspezifischer Marker wie PSA oder AR sowie prostataspezifische Merkmale auf DNA-Ebene sind bei den gängigen permanenten Zelllinien nicht existent, sodass deren Herkunft aus Prostatakarzinommetastasen fragwürdig erscheint. Zudem erwiesen sich einige permanente Zelllinien, welche als eigenständige Zelllinien des Prostatakarzinoms deklariert wurden, bei genauerer Analyse als Sub-Zelllinien von DU-145, PC-3 oder LNCaP (Sobel & Sadar, 2005).

Der fehlende Androgenrezeptor bei den Zelllinien DU-145 und PC-3 wurde häufig als Äquivalent eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms angesehen, was nicht zutreffend ist, da der Androgenrezeptor bzw. dessen Aberrationen insbesondere beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom eine entscheidende Rolle spielen (Scher & Sawyers, 2005).

2.4 Eigenschaften der Sphäroidkultur als präklinisches Tumormodell des Prostatakarzinoms

Anders als 2-dimensionale Tumormodelle, in denen die Zellen meist als Monolayer kultiviert werden, weisen multizelluläre Heterosphäroidkulturen Charakteristika auf, die auch in soliden Tumoren vorzufinden sind: Hierzu zählt in erster Linie das Vorhandensein des sog. „microenvironment“, welches die Tumorzellen umgibt. Tumorzellen werden von einem Stroma, bestehend aus glatten Muskelzellen, Nervenzellen, Lymph- und Blutgefäßen, sowie Fibroblasten und inflammatorischen Zellen umgeben. Die Metamorphose der Tumorzellen wird entscheidend durch das „microenvironment“ beeinflusst, da sowohl eine biochemische, also auch mechanische Interaktion zwischen den Zellen innerhalb des Gewebeverbandes stattfindet (Hoarau-Véhot, Rafii, Touboul, & Pasquier, 2018). Hierzu gehört eine Kommunikation zwischen Tumorzellen und Stromazellen, Tumorzellen und extrazellulärer Matrix, sowie Interaktionen zwischen Tumorzellen und weiteren nicht malignen Zellen. Den Fibroblasten konnte eine wichtige Rolle als Tumorpromotoren zugeschrieben werden. Tumor-assoziierte Fibroblasten sind in der Lage, die Tumorgenese gutartiger Epithelien zu induzieren, während normale Fibroblasten der Prostata diese Eigenschaft nicht aufweisen (Cheteh et al., 2017; Clark et al., 2013).

Im multizellulären 3-dimensionalen Zellkultursystem organisieren sich die Zellen in sphärischer Architektur, da diese Geometrie eine Nährstoffversorgung für ein Maximum von Zellen ermöglicht (Abb. 1). Im Außenbereich dieser Struktur ist der Kontakt zum Nährmedium und zur Sauerstoffversorgung sowie der Möglichkeit des Abtransportes von CO₂ am wenigsten behindert, weswegen sich dort mehrere Schichten proliferierender Zellen sammeln. Im Inneren befinden sich ruhende, nicht in Teilung befindliche Zellen. Abhängig von der Sphäroidgröße können im Zentrum Bedingungen vorliegen, in denen kein Zellüberleben möglich ist. (Lin & Chang, 2008).

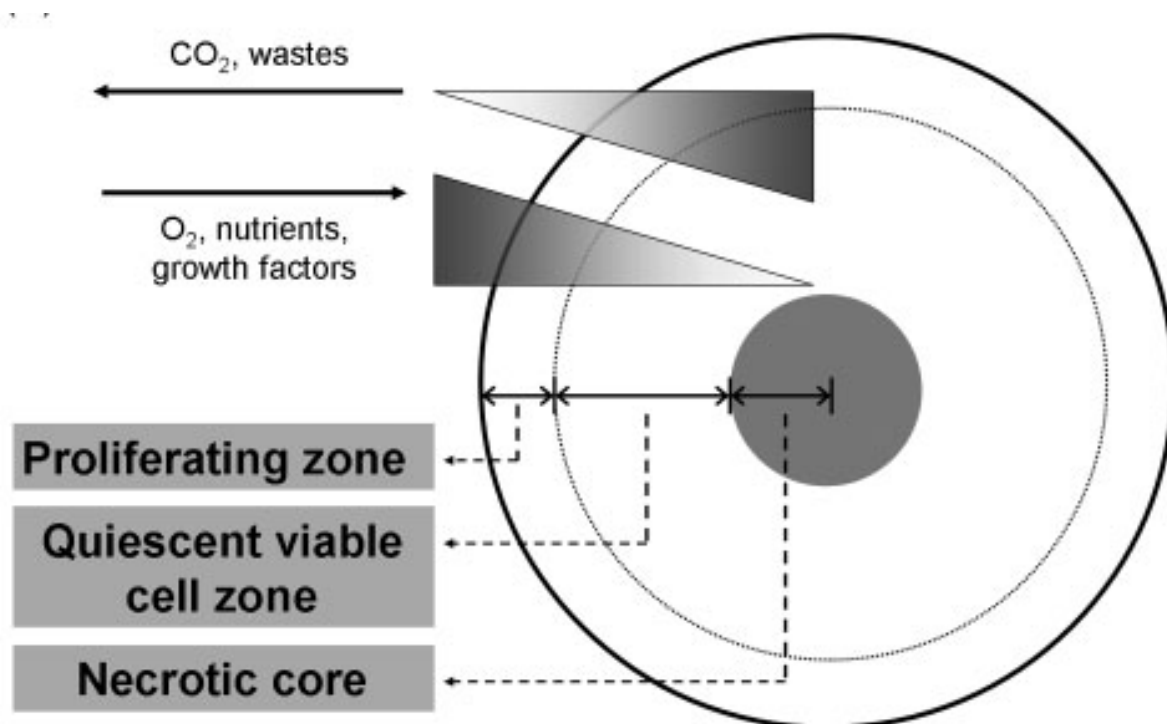


Abbildung 1: Architektur eines multizellulären Sphäroids. Quelle: Lin, R. Z., & Chang, H. Y. (2008). *Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnology journal*

Nicht nur die Weiterentwicklung des Tumors, sondern auch die Empfindlichkeit gegenüber therapeutischen Interventionen und die Entwicklung von Resistenzmechanismen könnte anhand einer geeigneten Sphäroidkultur präklinisch untersucht werden (Nunes et al., 2019).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Resistenzentwicklung von Tumoren gegenüber antiproliferativen Medikamenten durch eine sogenannte „multizelluläre Resistenzentwicklung“ (MCR) entsteht. Diese wird durch gemeinsame Interaktionen von Tumorzellen und ihrer Mikroumgebung, u.a. durch E-Cadherine und Integrine vermittelt (Bates, Lincz, & Burns, 1995; Croix & Kerbel, 1997).

Der Resistenzmechanismus geht jedoch verloren, sobald die Zell-Zell Kontakte unterbrochen werden (Desoize & Jardillier, 2000). Die Untersuchung derartiger Zusammenhänge ist nur anhand von multizellulären 3-dimensionalen Zellkultursystemen möglich.

Die Prostatakarzinomforschung kann also durch aussagekräftige in vitro Modelle entscheidend vorangetrieben werden. Erkenntnisse aus den bisher intensiv beforschten 2-dimensionalen Zellkulturen können mittels Sphäroidkulturen bestätigt und erweitert werden.

Die Sphäroidkultur als 3-dimensionales Tumormodell ist notwendig, um die Lücke zwischen Monolayerkulturen und Xenograftmodellen zu schließen (Laurent et al., 2013).

2.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist die Etablierung eines präklinischen Modells, welches eine in vitro Kultivierung von Tumorgewebe der Prostata ermöglicht. Das Tumormodell soll einen direkten Bezug zum lokalisierten Tumor herstellen können und die in vitro Verfügbarkeit von Tumormaterial für Forschungszwecke vereinfachen. So könnten die bisher unzureichend verstandenen molekularen Mechanismen der Entstehung und des Voranschreitens des Prostatakarzinoms sowie spezifische therapeutische Ansätze systematisch und kosteneffizient präklinisch untersucht werden.

Grundlage und Motivation der Arbeit ist die zuvor erfolgreiche Etablierung eines in vitro Tumormodells, bei dem es gelang, Mausxenografts der LuCaP Reihe in einem speziellen Medium als Sphäroide zu kultivieren, zu passagieren und zu charakterisieren. Besonderheiten dieser Sphäroid-Kultur waren die ständige Beibehaltung von Zell-Zell Kontakten, sowie deren Verstärkung durch sogenannte „small Molecules“ (Young et al., 2013).

Im Rahmen der Übertragung des Xenograft-Modells auf primäres Patientenmaterial sind folgende Fragen zu beantworten:

- 1) Ist eine ausreichende Materialgewinnung von primärem Prostatakarzinom-Gewebe möglich?
- 2) Durch welche Methodik kann eine Überführung des primären Prostatakarzinom-Gewebes in eine Sphäroid Kultur ermöglicht werden?
- 3) Welche Kultivierungsbedingungen ermöglichen eine passagere Kultur und wie kann die Viabilität der Sphäroide nachgewiesen werden?
- 4) Wie kann eine Phänotypisierung der Sphäroidkultur zur Charakterisierung vorhandener Zelltypen ermöglicht werden?
- 5) Ist die Proliferation der Tumorzellen in der Sphäroidkultur nachweisbar?

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Permanente Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete permanente Zelllinien

| Zelllinie | Ursprung | Bezug |
|-----------|----------------------|-------|
| LNCaP | Lymphknotenmetastase | DSMZ |
| PC-3 | Knochenmetastase | DSMZ |
| DU145 | Hirnmetastase | DSMZ |

3.1.2 Primärkulturgewebe

Das für die Etablierung des Tumormodells verwendete Prostata-Gewebe wurde in den Operationssälen der Klinik für Urologie und Kinderurologie am Universitätsklinikum des Saarlandes nach radikaler Prostatektomie gewonnen. Dabei wurden folgende Einschlusskriterien definiert: Ein Gleason-Score von ≥ 7 , die Tumorstadien T2 b/c, T3 und T4, sowie eine PSA Wert von $> 4\text{ng/ml}$.

In einem Fall wurde das Gewebe in palliativer Situation unter Androgendeprivation durch transurethrale Resektion gewonnen (Fall 3).

Unmittelbar nach Entnahme wurde das Resektat auf Eis in das Institut für Pathologie transportiert. Dort wurde ein tumorverdächtiges Areal von ca. 0,5-1 cm im Durchmesser, bei einer Dicke zwischen 0,5-2 mm durch einen erfahrenen Pathologen unter sterilen Kautelen herausgeschnitten. Ein Teil des herausgeschnittenen Gewebes wurde für vergleichende Untersuchungen kryokonserviert, der andere Teil wurde in 10 ml Zellkulturmedium (RPMI + doppelt Pen/Strep) in das urologische Forschungslabor transportiert und dort direkt weiterverarbeitet. Eine Einverständniserklärung aller Patienten zur Verwendung des Gewebes für Forschungszwecke wurde eingeholt. Ein positives Ethikvotum für die Gewebeasservation liegt vor (Votum 188/05).

3.1.3 Zellkulturmedien und Reagenzien für permanente Zelllinien und Primärkulturen

| Produkt | Hersteller | Bestellnummer |
|---|-------------------|---------------|
| Bovine serum albumin 25% (BSA) | Life Technologies | A10008-01 |
| CellTiter 96® AQueous One Solution- Cell Proliferation Assay (MTS) | Promega | G3580 |
| Collagenase Type I | Sigma | C0130 |
| DMEM | Sigma | D5796 |
| DMSO ≥99.7%, Hybri-Max™ | Sigma | D2650 |
| DMEMF-12 with GlutaMAX™ | Life Technologies | 10565-018 |
| Dulbecco's PBS | Sigma | D8537 |
| Fetal Bovine Serum | Sigma | A7906 |
| FGF-Basic | Life Technologies | PHG0026 |
| LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit | Life Technologies | L3224 |
| Penicillin/Streptomycin | Sigma | P4333 |
| RPMI | Sigma | R8758 |
| R-1881 | Sigma | R0908 |
| StemPro® hESC Supplement | Life Technologies | A10006-01 |
| Trypanblau, 0,4 % | Sigma | T8154 |
| Trypsin-EDTA-Lsg. | Sigma | T3924 |
| Y-27632 | Sigma | Y0503 |

3.1.4 Zellkultur Verbrauchsmaterialien

| Name | Hersteller | Bestellnummer |
|---|------------------|---------------|
| Cryoröhrchen | Greiner | 122278 |
| Combitips, 2,5 ml | Eppendorf | 0030089448 |
| EASYstrainer™ 40 µl | Greiner | 542040 |
| EASYstrainer™ 100 µl | Greiner | 542070 |
| Eppendorf Tubes 0,5 ml | Merck-Eurolab | 211F2140 |
| Eppendorf Tubes 1,5 ml | Merck-Eurolab | 211F2190 |
| Eppendorf Tubes 2,0 ml | Merck-Eurolab | 211F2120 |
| Objektträger | Langenbrink | 8470274 |
| Pasteurpipetten 150 mm | Hirschmann | H150 |
| Petrischale 19,6 cm ² | Becton Dickinson | 353004 |
| Pipetten 25 ml | Becton Dickinson | 357525 |
| Pipetten 10 ml | Becton Dickinson | 357551 |
| Pipetten 5 ml | Becton Dickinson | 357543 |
| Pipetten 2 ml | Becton Dickinson | 357507 |
| Pipetten 1 ml | Becton Dickinson | 357521 |
| Pipettenspitzen 1000 µl | Ratiolab | 2130612 |
| Pipettenspitzen 200 µl | Ratiolab | 2130602 |
| Pipettenspitzen 10 µl | Ratiolab | 2553502 |
| Skalpell | Braun | 4505517829 |
| Watte für gestopfte Pipetten | Integra | 172010 |
| Zentrifugenröhrchen, konisch (15/50 ml) | Becton Dickinson | 352095 |
| Zentrifugenröhrchen Rundboden (14 ml) | Becton Dickinson | 352057 |
| Zellkulturflasche, 25 cm ² | Becton Dickinson | 353108 |
| Zellkulturflasche, 75 cm ² | Becton Dickinson | 353136 |
| 96-well Platten | Becton Dickinson | 353072 |

| | | |
|------------------------------------|------------------|--------|
| 24-well Platten | Becton Dickinson | 353504 |
| 6-well Ultralow Attachment Platten | Corning | 3471 |

3.1.5 Chemikalien

| Name | Herseller | Bestellnummer |
|---|------------------------|---------------|
| Agarose | Serva | 11406.01 |
| Aqua B. Braun Ecotainer | Braun | 140148001 |
| Ethanol 99% vergällt mit MEK | Zentr. Chem. Lager UdS | 702543 |
| Eosin G, gelblich | Merck | 1.15935 |
| Kalimchlorid | Merck | 1049361000 |
| Kaliumhydrogenphosphat, p.a., ISO | Merck | 1051041000 |
| Mayers Häkalaunlösung | AppliChem | A0884 |
| Methanol | Zentr. Chem. Lager UdS | 701224 |
| Di-Natriumhydrogenphosphat, p.a. | Merck | 700834 |
| Natriumchlorid | Grüssing | 701314 |
| Calciumchlorid | Merck | 1023811000 |
| Paraformaldehyd, reinst | Merck | 14040051000 |
| TWEEN® 20 | Roth | P1379 |
| Vektor Vectashield Mounting Medium | Linaris | H-1000 |
| Vektor Vectashield Mounting Medium mit DAPI | Linaris | H-1200 |
| Xylol, Isomerengemisch | Zentr. Chem. Lager UdS | 701864 |
| 3-(Triethoxysilyl)-propylamin (Silan) | Merck | 8.21619 |

3.1.6 Lösungen

1xPBS

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 8,2 mM

KH₂PO₄ 1,47 mM

PH 7,0

Tris/HCL

Tris 0,1 mM

pH 7,2; einstellen mit 2 N HCl

Blockierlösung

80 ml 0,1 M Tris/HCl

3 g BSA

20 ml FCS

PBS/0,1%BSA

100 ml 1x BPS pH 7,0

100 mg BSA

3.1.7 Geräte

| Name | Hersteller |
|---|-----------------------|
| Brutschrank, HeraCell | Heraeus |
| Camera Control Unit | Nikon |
| Kamera, DM100 Digital Net Camera | Nikon |
| Magnetrührer MR 2002 | Heidolph |
| Mikroskop Eclipse E600 | Nikon |
| Mikroskop DX 61 | Olympus |
| Mikroliterpipette (2/10/20/200/1000 µl) | Gilson |
| PipetBoy acu | Integra Bioscices |
| Reader Infinite F200 PRO | Tecan |
| Sterilbank, HERAsafe | Heraeus |
| Tischzentrifuge Minispin | Eppendorf |
| Umkehrmikroskop Eclipse TS100 | Nikon |
| Umkehrmikroskop, Axiovert S100 | Zeiss |
| Vakuumpume, Vacusafe | Heraeus |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| Waage 1104 | Sartorius |
| Waage 770-12 | Kern |
| Zentrifuge 5804 | Eppendorf |

3.1.8 Primär- und Sekundärantikörper für die Immunzytochemie

Tabelle 2: Primärantikörper für die immunzytochemische Charakterisierung der permanenten Zelllinien sowie der Primärkulturen

| Antikörpern | Bezeichnung | Klon | Hersteller | Verdünnung |
|-------------|--|-------|-----------------------|------------|
| AR | Monoclonal Rabbit Anti-Androgen Receptor | SP107 | Sigma | 1:200 |
| Ki67 | Monoclonal Mouse Anti-Human Ki67-Antigen | MIB-1 | Dako | 1:200 |
| CK-5 | Monoclonal Mouse Anti-Cytokeratin 5 | XM26 | Diagnostic Biosystems | 1:200 |
| CK-8 | Monoclonal Mouse Anti-Cytokeratin 8 | M20 | Sigma | 1:200 |

Tabelle 3: Sekundärantikörper für die immunzytochemische Charakterisierung der permanenten Zelllinien sowie der Primärkulturen

| Antikörper | Bezeichnung | Hersteller | Verdünnung |
|-------------|--|------------|------------|
| Anti-Mouse | Cy3-conjugated AffiniPure Goat anti Mouse IgG (H+L), polyclonal | Dianova | 1:400 |
| Anti-Rabbit | Cy3-conjugated AffiniPure Goat anti Rabbit IgG (H+L), polyclonal | Dianova | 1:400 |
| Anti-Rabbit | FITC (fluorescein isothiocyanate) Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), polyclonal | Dianova | 1:400 |

3.2 Methodik

3.2.1 Kultivierung der permanenten Zelllinien

Die Zelllinien aus Tabelle 4 wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen mit 2 ml Medium ausgesät. Die Zellkultivierung erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ Gehalt. Nach drei Tagen wurde das Zellkulturmedium gewechselt, um den Zellen neue Nährstoffe zur Verfügung zu stellen.

Tabelle 4 fasst die Medien der verschiedenen Zelllinien sowie deren Zusätze zusammen

Tabelle 4: Kulturmedien und Zusätze für die permanenten Zelllinien

| Zelllinie | Medium | Zusätze |
|-----------|-----------|-------------------------------------|
| LNCaP | RPMI-1640 | 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin |
| DU145 | RPMI-1640 | 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin |
| PC-3 | DMEM | 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin |

3.2.2 Passagierung der permanenten Zellen

Vor dem Erreichen einer Konfluenz der Zellen von ca. 80% wurden diese passagiert. Nach Absaugung des Kulturmediums wurden die adhärennten Zellen durch 10-minütige Inkubation mit 2 ml 0,2%Trypsin/0,25%EDTA bei 37 °C vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde danach mit einer 150 mm Pasteur Pipette in ein 14 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 ml serumhaltigem Medium resuspendiert, um die Trypsinreaktion zu stoppen.

Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (3 min/1100 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit frischem Kulturmedium versetzt. Danach wurden die Zellen in eine neue 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Dabei wurde für LNCaP ein Verdünnungsfaktor von 1:3–1:6, für DU145 und PC-3 ein Verdünnungsfaktor von 1:10 verwendet.

3.2.3 Zellzählung

Zur Verwendung einer definierten Zellzahl wurden 20 µl einer Zellsuspension mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt und die Gesamtzahl der in der Zellsuspension befindlichen Zellen errechnet.

3.2.4 Kultivierung von Sphäroiden aus LNCaP Zellen

Es wurden Sphäroide aus LNCaP Einzelzellen hergestellt, um daran die Immunhistochemie und Immunzytochemie zu üben und um als Vorversuch zur Primärkultur eine Vereinzelung von Sphäroiden zu erproben. Dazu wurden zunächst die Vertiefungen einer 96-Well Mikrotiterplatte mit 50 µl Agarose gefüllt.

Hierfür wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben 75 mg Agarose abgewogen und mit 50 ml RPMI-Medium vermischt. Durch dreimaliges Aufkochen der Suspension in der Mikrowelle bei 450 Watt wurde die Agarose im Medium gelöst. Die flüssige Agaroselösung wurde nun in ein vorgewärmtes Wännchen auf eine auf 80°C vorgeheizte Heizplatte gestellt. Alle Wells wurden nun mittels 200 µl Multikanalpipette mit 50 µl Agaroselösung ausgekleidet.

Nach vollständigem Erstarren der Agaroselösung wurden in jedes Well 100 µl Zellsuspension ausgesät. Es wurden Zellzahlen von 1000, 2500 und 5000 pro 100 µl ausgesät. In die Wells am Rand der Mikrotiterplatte wurde als Verdunstungsschutz nur Medium vorgelegt. Die Mikrotiterplatte wurde dann im Brutschrank für eine Woche inkubiert.

3.2.5 Vereinzelung der LNCaP Sphäroide

Die LNCaP Sphäroide wurden mittels 200 µl Pipette aus den Wells abgesaugt und in ein mit 10 ml PBS gefülltes 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, um die Sphäroide darin zu waschen. Danach wurden die Sphäroide zentrifugiert (3 min/1100 rpm). Das überstehende PBS wurde abgesaugt. Zur Vereinzelung wurden die Sphäroide wie in 2.2.2 trypsinisiert. Anschließend wurde die (3 min/1100 rpm) Suspension zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit frischem Kulturmedium resuspendiert.

3.2.6 Gewinnung des Prostatagewebes im Rahmen der radikalen Prostatektomie

Das Prostatagewebe wurde im Rahmen einer laparoskopischen radikalen Prostatektomie gewonnen, welche mittels Da- Vinci-Operationssystem durchgeführt wurde. Ausschließlich bei Patientenfall Nr. 3 wurde das Gewebe im Rahmen einer palliativen TUR-P gewonnen. Unmittelbar nach der Gewebeentnahme wurde das Resektat auf Eis in das Institut für Pathologie transportiert. Nach dortiger Aufarbeitung (2.1.2) wurde das Gewebe ins urologische Forschungslabor gebracht.

3.2.7 Prozessierung und Kultivierung des primären Prostatakarzinomgewebes

Das Gewebe wurde unter der Sterilwerkbank in eine Petrischale überführt und darin mit 5 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die maximale mechanische Zerkleinerung des Gewebestückchens mittels Einmalskalpell. Dieser Vorgang dauerte je nach Festigkeit des Gewebes zwischen 15 bis 25 min. Währenddessen wurde das Gewebe in einem Tropfen Verdaumedium (Tabelle 5) feucht gehalten. Im Anschluss wurde das restliche Verdaumedium (5 ml) hinzugegeben und im Brutschrank für 3-4 Stunden inkubiert. Der Fortschritt des Gewebeverdaus wurde alle 30 min. unter dem Zellkulturmikroskop kontrolliert. Die Vereinzelung der Zellen wurde alle 30 min. durch Auf- und Abpipettieren mittels 1000 µl Pipette unterstützt. Der Verdau wurde

gestoppt, sobald sich einzelne Zellverbände von den mechanisch zerkleinerten Gewebestückchen lösen, jedoch auch bevor sich eine größere Zahl von Einzelzellen zeigte. Die Suspension wurde dann in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (3 min/1100 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Mit einer an der Spitze abgeschnittenen 1000 µl Pipette wurde die Suspension nun durch einen Zellfilter mit einer Porengröße von 100 µm gespült. Die gefilterte Suspension wurde anschließend durch einen Zellfilter mit 40 µm Porengröße gegeben. Um die im Filter zurückbleibenden Gewebestückchen herauszulösen, wurden die Filter umgekehrt über je ein Well einer 6-Well Mikrotiterplatte gehalten und die Gewebestückchen mit 5 ml PBS in das jeweilige Well gespült. Es entstanden auf diese Weise drei Fraktionen mit unterschiedlich großen Gewebefragmenten (Abb. 2). Diese Fraktionen wurden mittels abgeschnittener 1000 µl Pipette in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (3 min/1100 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und jede Unterfraktion des Zellmaterials mit 2 ml Kulturmedium + 2 µM Y-27632 + 10 nM R1881 (Tabelle 6) resuspendiert. Die Fraktionen wurden benannt in „Stückchen 100 µm“, „Stückchen 40 µm“ und „Single Cells“. Die Kultivierung erfolgte in 6-well ultralow Attachment Mikrotiterplatten bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ Gehalt.

Tabelle 5: Verdaumedium und Zusätze

| | |
|--|--------|
| DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep | 4,5 ml |
| Collagenase (2000U/ml; Endkonzentration 200U/ml) | 0,5 ml |
| Calcium-Lösung (320 mM) | 50 µl |
| 0,2%Trypsin/0,25%EDTA | 5ml |

Tabelle 6: *Stempro Medium und Zusätze für die Primärkulturen*

| | |
|--------------------|---------|
| DMEM/F-12+Glutamax | 45,4 ml |
| StemProhESC | 1ml |
| BSA 25% | 3,6ml |
| FGF-basic | 4µl |
| 2-Mercaptoethanol | 91µl |
| Pen/Strep | 0,5ml |
| R1881 | 10µl |
| Y-27632 | 10µl |

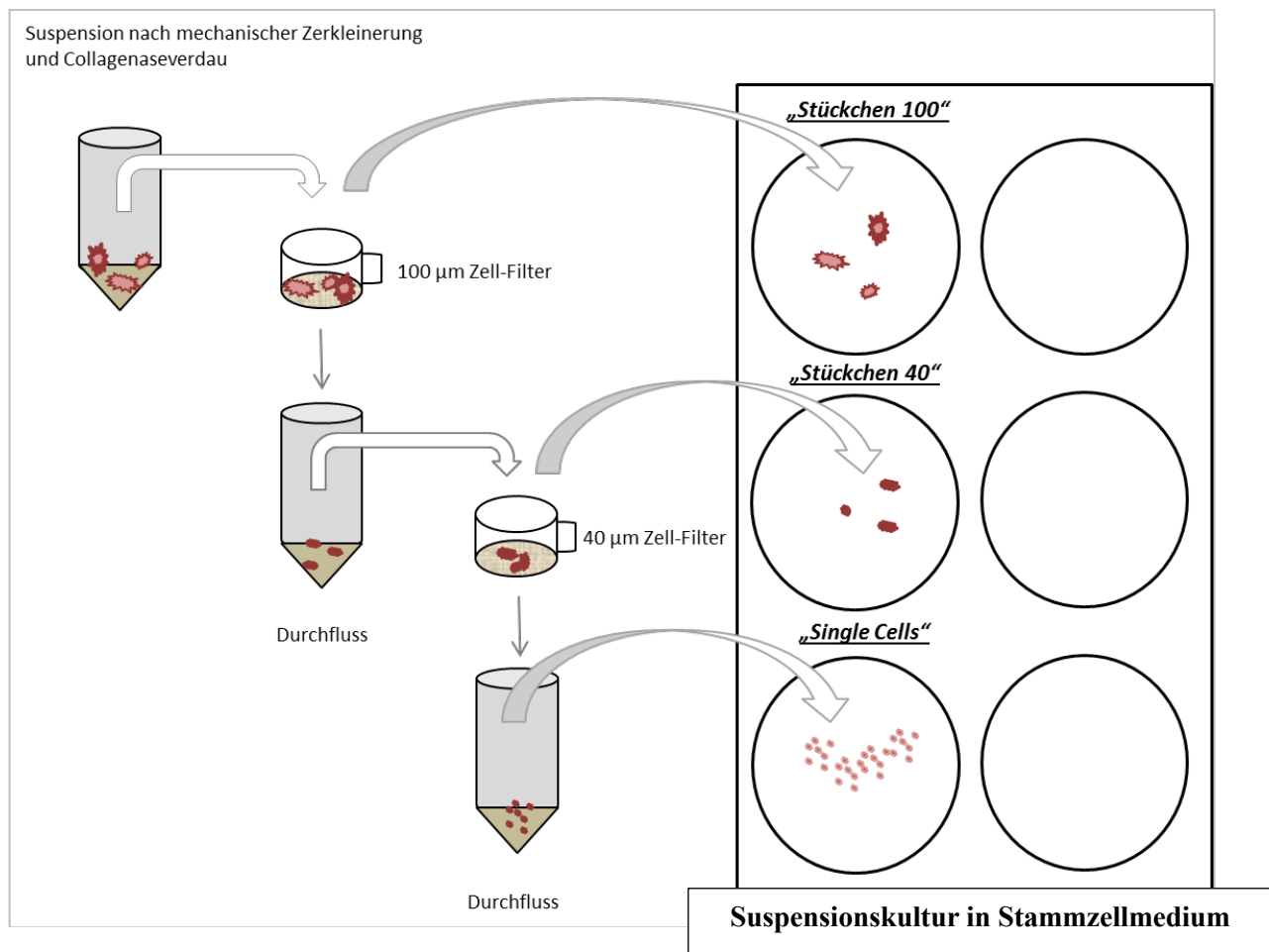


Abbildung 2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Gewebeprozessierung nach mechanischer Zerkleinerung und Collagenase-Verdau (eigene Darstellung)

3.2.8 Medienwechsel der Primärkultur

Der Medienwechsel erfolgte zweimal pro Woche. Dazu wurden alle Fraktionen der 6-well ultralow Attachment Mikrotiterplatten in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets wurden mit 2 ml frischen Kulturmediums + 10nM R1881 resuspendiert. Danach wurden die Suspensionen zurück in ihre Wells überführt.

3.2.9 Passagierung der Primärkultur

Die Morphologie und Formation der Sphäroide wurde ständig verlaufskontrolliert. Bei Verdichtung oder Vergrößerung der Sphäroide wurden diese passagiert, indem sie entweder erneut mit Collagenase, oder mit 0,2%Trypsin/0,25%EDTA verdaut wurden. Besonders große Sphäroide wurden zusätzlich mit dem Einmalskalpell mechanisch zerkleinert. Der Collagenaseverdau wurde angewendet, wenn mikroskopisch innerhalb eines Sphäroids zwischen den Zellen viel extrazelluläre Matrix sichtbar war. Der 0,2%Trypsin/0,25%EDTA Verdau wurde angewendet, wenn die Sphäroide hauptsächlich aus dicht gepackten Zellen bestanden.

Für den Kollagenaseverdau wurde der Inhalt eines zu passagierenden Wells in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (3 min/1100 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5 ml Collagenase-Verdaumedium (Tab. 6) resuspendiert und für ca. 3 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei der Fortschritt des Gewebeerdaus alle 30 min unter dem Zellkulturmikroskop kontrolliert wurde und zu dem Zeitpunkt gestoppt wurde, als sich kleinere Zellfragmente von den Sphäroiden lösten.

Durch Zentrifugation (3 min/1100 rpm) und Absaugung des Überstandes wurde die Collagenase entfernt. Das Pellet wurde mit 2 ml frischen Zellkulturmediums + 2µM Y-27632 + 10 nM R1881 resuspendiert.

Der Trypsinverdau erfolgte mit 2 ml 0,2%Trypsin/0,25%EDTA in gleicher Weise wie der Collagenaseverdau, wobei die Zeit des Verdaus je nach Festigkeit der Sphäroide lediglich 5-20 min betrug. Der Fortschritt des Gewebeerdaus wurde alle 2 min unter dem Zellkulturmikroskop kontrolliert und wie beim Collagenaseverdau nach Abspaltung kleinerer Zellfragmente durch Zugabe von 1 ml serumhaltigen Mediums gestoppt. Danach entsprechend dem Collagenase-Verdau Pelletierung, Absaugung des Überstandes und Resuspendierung mit 2 ml frischem Zellkulturmedium + 2 µM Y-27632 + 10 nM R1881.

3.2.10 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Zellviabilität der Primärkultur

Zum Vitalitätsnachweis der in Kultur befindlichen Sphäroide wurde ein Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assay (LIVE/DEAD® Cell Viability Assays) angewendet. Die erste Substanz des Assays, Calcein AM kann die Zellmembran vitaler Zellen penetrieren. Im Zytoplasma wird durch unspezifische Esteraseaktivität die Acetomolekülgruppe des Calcein-AM abgespalten. Dadurch kann das entstandene Calcein intrazelluläre Calciumionen komplexieren, wodurch die vitalen Zellen grün fluoreszieren. Die zweite Substanz, das rot fluoreszierende Ethidium-Homodimer-1 kann nur die beschädigte Zellmembran toter Zellen passieren,

interkaliert mit deren DNA und sorgt für eine fluoreszenzmikroskopische Rotfärbung dieser avitalen Zellen.

In einem Vorversuch wurden zunächst die optimalen Konzentrationen für die o.g. Substanzen Calcein AM und Ethidium-Homodimer-1 anhand der Zelllinie LNCaP getestet. Dazu wurden 3×10^3 Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät und drei Tage inkubiert. Beide Substanzen wurden in den Konzentrationen $10 \text{ }\mu\text{M}$, $1 \text{ }\mu\text{M}$ und $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ mit einer Inkubationszeit von 45 Minuten getestet. Für die Konzentrationsbestimmung des Ethidium-Homodimer-1 wurden die Zellen zuvor durch 10-minütige Inkubation mit 70% Ethanol (-20°C) abgetötet.

Für den Viabilitätstest der primären Zellkulturen wurden unter der Sterilwerkbank $100 \text{ }\mu\text{l}$ Sphäroid-Suspension eines zu untersuchenden Falles mittels $1000 \text{ }\mu\text{l}$ Pipette aufgenommen und in eine mit 3 ml PBS befüllte Petrischale überführt. Unter dem Zellkulturmikroskop konnten dann gezielt einzelne Sphäroide mittels $20 \text{ }\mu\text{l}$ Pipette aufgenommen werden. Diese Sphäroide wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte gegeben, in deren Vertiefungen zuvor $100 \text{ }\mu\text{l}$ Assay vorgelegt wurde. Nach 45 minütiger Inkubation wurde das Ergebnis mittels inverser Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

3.2.11 Fixierung der Primärkultur auf Objektträger

Für die immunhistochemische Charakterisierung der Primärkultur wurden verschiedene Methoden der Fixierung von Zellen auf Objektträgern erprobt. Diese Vorversuche wurden anhand der Zelllinie LNCaP durchgeführt. Ziel der Vorversuche war es, eine geringe Zellzahl effektiv auf Objektträger zu fixieren und immunhistochemisch sichtbar zu machen, um später für die Färbung der Primärkultur möglichst wenig des limitierten Zellmaterials zu verwenden.

Zunächst wurden 3×10^3 Zellen in 24 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät und für drei Tage kultiviert. Durch 10-minütige Trypsinierung mit $0,2\%$ Trypsin/ $0,25\%$ EDTA, Resuspendierung mit $0,5 \text{ ml}$ serumhaltigen Mediums und anschließendem Waschen der Zellen in 10 ml PBS, wurden die Zellen für die nachfolgend beschriebenen Fixierungsmethoden vorbereitet. Ebenfalls wurden dieselben Fixierungsmethoden mit zuvor vereinzelter LNCaP Sphäroiden getestet.

3.2.12 Auftropfen einer Zellsuspension auf Objektträger

10^5 Zellen wurden in 5 ml PBS resuspendiert. Dann wurden Silan beschichtete Objektträger auf eine auf 65°C erwärmte Heizplatte gelegt. Nun wurden auf den Objektträger nebeneinander drei Tropfen mit einem Volumen von $20 \text{ }\mu\text{l}$ aufgetropft und für 5 min auf der Heizplatte getrocknet. Anschließend wurden die in 2.2.14 beschriebenen Färbeschritte durchgeführt.

3.2.13 Aufspinnen einer Zellsuspension auf Objektträger mittels Zytocentrifuge

Die Trichter der Zytocentrifuge wurden mit $500 \text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension gefüllt. Dabei wurden Zellzahlen von 10^6 , 5×10^5 und 5×10^3 Zellen pro $500 \text{ }\mu\text{l}$ getestet. Die Suspensionen wurden für 5 min bei 400 Umdrehungen pro Minute auf die Objektträger gespinnt. Anschließend wurden die Zytospins nativ unter dem Mikroskop

beurteilt. Die Objektträger wurden in Alufolie gewickelt und bei -20°C gelagert oder direkt immunzytochemisch gefärbt. Für das Aufspinnen der Primärkultur wurden die zu färbenden Sphäroide mit einer 200 µl Pipette aufgenommen und mittels 0,2%Trypsin/0,25%EDTA enzymatisch aufgeschlossen. Der Verdau dauerte je nach Festigkeit der Sphäroide zwischen 15 und 25 min.

3.2.14 Immunzytochemische Färbungen des Primärmaterials

Es wurde eine fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Differenzierungsmarker CK-8 und des AR als Luminalzellmarker, sowie CK-5 als Basalzellmarker durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht, um Zellen, welche sich in Teilung befinden, darzustellen.

Die zu färbenden Zellen wurden auf den Objektträgern mit einem Wachsstift (DAKO Pen) umkreist. Zur Fixierung der Zellen wurden 200 µl 2%-ige PFA Lösung auf jeden umkreisten Spot pipettiert und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, indem sie zweimal für eine Minute in eine mit 1x PBS gefüllte Glasküvette gestellt wurden. Danach wurden zur Permeabilisierung 200 µl Methanol (-20°C) auf die Spots pipettiert und für 10 min inkubiert. Dann erneutes Waschen in 1x PBS (2x 1min). Anschließend wurden zur Blockierung der Bindestellen 200 µl Blockierlösung auf die Spots gegeben und für weitere 15 min inkubiert. Nun wurden 100 µl des Primärantikörpers (gelöst in PBS/1% BSA) auf die Zellen pipettiert. Der Primärantikörper wurde für 45 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erneutes Waschen in PBS-Tween (2x 1min). Dann wurden 100 µl des Sekundärantikörpers (gelöst in PBS/1% BSA) auf die Objektträger gegeben, wobei ab hier im abgedunkelten Raum gearbeitet wurde. Nach 30 minütiger Inkubation des Sekundärantikörpers wurde die Zellen erneut in PBS-Tween gewaschen (2x 1min) und im Anschluss mit DAPI/Antifade eingedeckt.

3.2.15 Suspensionsfärbung

Für die Färbung in Suspension wurden 10^5 Zellen der Zelllinie LNCaP in 6 ml PBS resuspendiert, um die Zellen zu waschen. Anschließend Zentrifugation (3 min/1100 rpm) und Absaugung des Überstandes. Dann Hinzugabe von 6 ml Methanol (-20°C), 10-minütige Inkubation auf Eis um die Zellen zu permeabilisieren. Anschließend zweimaliges Waschen der Zellen mit 10 ml PBS durch jeweilige Zentrifugation und Absaugen des Überstandes. Hinzugabe von 6 ml Blockierlösung zur Blockierung der Bindestellen. Die Blockierlösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch Zentrifugation und Absaugung des Überstandes entfernt. Hinzugabe des Primärantikörper (Cy3) gelöst in PBS/1% BSA in einer Konzentration von 1:200. Der Primärantikörper wurde für 45 min inkubiert. Danach zweimaliges Waschen mit PBS-Tween. Anschließend erfolgte die Hinzugabe der Sekundärantikörper (gelöst in PBS/1% BSA) die für 45 min inkubiert wurden. Danach erneut zweimaliges Waschen mit PBS-Tween. Nun wurde die Zellsuspension auf Objektträger aufgetropft, wobei ein Tropfen ein Volumen von 20 µl beinhaltete. Die Tropfen wurden bei Raumtemperatur getrocknet und mit DAPI/Antifade eingedeckt.

3.2.16 Fixierung und Einbettung von Sphäroiden in Paraffinblöcke

Zunächst wurden die einzubettenden Sphäroide mittels 200 µl Pipette aus ihren Wells isoliert und in 10 ml 1x PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Sphäroide in 1 ml einer 4%-igen PFA Lösung für vier Stunden inkubiert und nach Zentrifugation (3min/1100rpm) in 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Sphäroide mittels an der Spitze abgeschnittener 200 µl Pipette in 80 µl flüssiger Agarose aufgenommen und in 0,2 ml PCR Tubes gegeben. Diese Tubes wurden zuvor am Boden abgeschnitten, sodass nach Erstarren der Agarose der Sphäroid-Agarose-Zylinder aus der Tube gedrückt werden konnte. Die Zylinder wurden in Gitterkassetten überführt und mittels aufsteigender Alkoholreihe (3x1h Ethanol 70%, 3x 1h Ethanol 99%) entwässert. Anschließend wurde das Ethanol durch Waschen in Xylol (2x 1h, 1x über Nacht) entfernt. Die Kassetten wurden dann in einen Exsikkator gegeben, der mit auf 60°C erhitztem Paraffin gefüllt war. Unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) wurde das Xylol durch Paraffin ersetzt (2x 1 h). Die Agarosezylinder wurden anschließend in Paraffin eingegossen. So konnte der Paraffinblock mit dem Rotationsmikrotom aufgeschnitten werden und die Schnitte auf Superfrost-Objektträger aufgebracht werden.

3.2.17 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Sphäroide

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Paraffinschnitte 3 x 10 min im Xylolbad deparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe dehydriert. (3 x Ethanol 99%, 3 x Ethanol 70%). Durch 10-minütige Inkubation in Mayers Hemalaunlösung wurden die Zellkerne gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte 3-mal in Leitungswasser gespült, gefolgt von 3-maligem Eintauchen in HCl-Alkohol. Nun wurden die Schnitte 10 min unter fließendes Wasser gebläut, wobei sich die bis dahin rötlich gefärbten Zellkerne durch Einfluss des alkalischen Leitungswassers ins Blauviolet färbten. Dann 30 sek Inkubation in Eosinlösung zur Färbung der Zytoplasmaproteine. Die Schnitte wurden danach mehrmals in Leitungswasser gespült und in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70%, 3 x Ethanol 99%) dehydriert. Nach 3-maligem Eintauchen in Xylol wurden die Schnitte mit Deckplättchen eingedeckt.

3.2.18 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)

Die zu untersuchenden Sphäroide wurden aus ihrem Well mittels 1000 µl Pipette aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 2 ml 0,2%Trypsin/0,25%EDTA unter Zugabe von 2 µl Y-27632 resuspendiert und für 10-20 min bei 37°C inkubiert. Alle 2-3 min wurde die Suspension auf- und abpipettiert und der Gewebeverdau unter dem Mikroskop kontrolliert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 2 ml serumhaltigen Mediums gestoppt, sobald nur noch Zellverbände zu sehen waren. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Suspension wurde zentrifugiert und die Zellen in StemPro Medium + 10 nM R1881 resuspendiert und zu Triplicates zu 10.000 und 15.000 Zellen in einem Volumen von 100 µl/Well in eine 96-well Mikrotiterplatte ausgesät. Als Negativkontrolle wurde ein Triplicate lediglich mit Stempro Medium befüllt. Nach 1, 4 und 7 Tagen wurden die Platten ausgelesen. Dazu wurden pro Well 20 µl des CellTiter 96®

AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) hinzupipettiert und dieser für weitere vier Stunden inkubiert. Dann wurde die 96-well Platte bei 492 nm (Referenz 670 nm) im Reader ausgelesen.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

Das primäre Prostatagewebe, welches für unsere Versuche asserviert werden konnte, war gering, daher war es notwendig, zur Vorbereitung und Austestung sämtlicher Versuche permanente Zelllinien zu verwenden. Hierzu zählten die Zelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3. Kultivierung und Passagierung der Zelllinien sowie die Herstellung und Vereinzelung von Sphäroiden (Abb. 4) aus LNCaP Zellen erfolgte anhand der bereits in unserem Forschungslabor etablierten SOP's. Nach Erlernen der Handhabung konnten die genannten Zelllinien zuverlässig kultiviert und passagiert werden. Es wurde eine ausreichende Menge an Zellkulturflaschen mit permanenten Zelllinien im Brutschrank bereitgehalten, um für die geplanten Assays ständig Zellmaterial vorzuhalten. Das Zellmaterial wurde während der Bereithaltung regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert (Abb. 3).

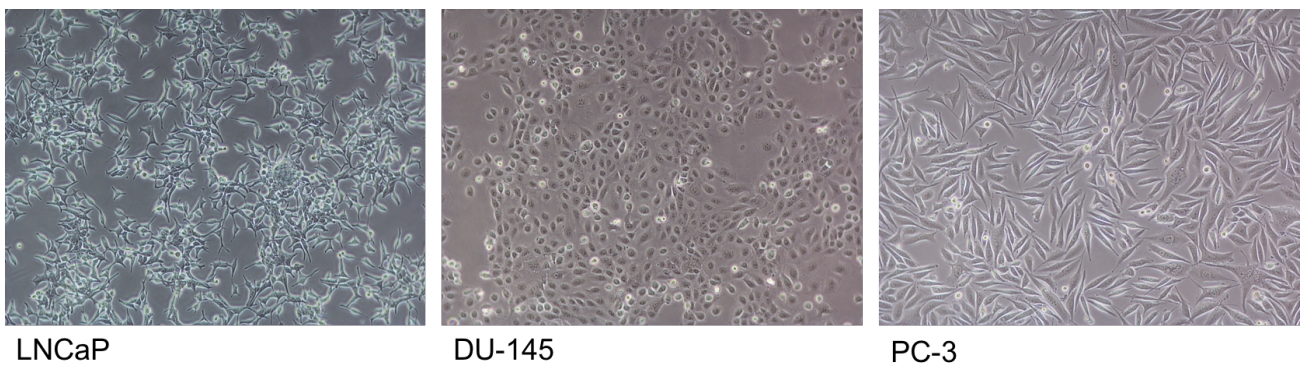


Abbildung 3: Hellfeldmikroskopie der Zelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3. 20-fache Vergrößerung.

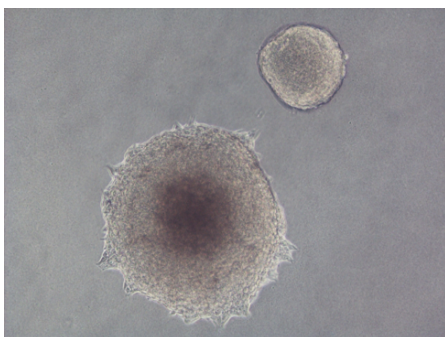


Abbildung 4: Sphäroid aus LNCaP Zellen nach 10-tägiger Kultivierung. 10-fache Vergrößerung

4.2 Prozessierung des primären Prostatagewebes

Eine Gewebeprozessierung und Kultivierung geeigneter Prostatektomiepräparate gelang in allen 12 Fällen in einem Zeitraum von sieben Monaten (Tabelle 7).

In der Regel wurde das Gewebe nach radikaler Prostatektomie gewonnen. Das Gewebe für Fall 3 wurde durch palliative TUR-P gewonnen.

Tabelle 7: Klinische Angaben der operierten Patienten. Angegeben sind Fallnummer, Datum der Gewebeverarbeitung, PSA-Wert bei Diagnosestellung (D) und bei Operation (OP), sowie der pathologiescher Befund nach OP

| Fall Nummer | Datum Ansatz | PSA bei Diagn./ PSA bei Therapie | Histopathologische Untersuchung |
|------------------------|--------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 26.06.2013 | D: 17,36 ng/ml OP: 10,84 ng/ml | Gleason 4+4=8 pT2b, pN0, R0 |
| 2 | 28.06.2013 | D: 6,6 ng/dl OP: 6,38 ng/ml | Gleason 4+5=9 pT3b, N1, R1 |
| 3 (Palliative TURP) | 28.06.2013 | LHRH Th. Seit 07/2011 OP: 0,4ng/ml | Gleason 5+5=10 |
| 4 | 04.07.2013 | D: 6,3 ng/ml OP: 6,19 ng/ml | Gleason 5+4=9 pT3b, N0, R1 |
| 5 | 28.10.2013 | D: 4,84 ng/ml OP: 5,49 ng/ml | Gleason 3+4=7a pT3a, N0, R1 |

| Fall Nummer | Datum Ansatz | PSA bei Diagn./ PSA bei Therapie | Histopathologische Untersuchung |
|-------------|--------------|-------------------------------------|--|
| 6 | 29.10.13 | D: 7,0ng/ml OP: 8,62 ng/ml | Gleason 5+4=9 pT3b, pN0, R0 |
| 7 | 24.11.2013 | D: 5,39 ng/dl OP: 7,55 ng/ml | Gleason 3+4=7a pT3a, pN0, R0 |
| 8 | 09.12.2013 | D: 4,99 ng/ml OP: 8,8 ng/ml | Gleason 4+3=7b pT3a, pN0, R0 |
| 9 | 18.12.2013 | D: 31,00 ng/ml OP: 33,49 ng/ml | Gleason 4+3=7b (Tertiär 5) pT3b, pN1, R0 |
| 10 | 20.12.2013 | D: 5,64 ng/dl OP: 5,16 ng/ml | Gleason 4+4=8 pT2a, pN0, R0 |
| 11 | 20.12.2013 | D: 13,40 ng/ml OP: 13,42 ng/ml | Gleason 4+3=7b pT3a, pN0, R0 |

| Fall Nummer | Datum Ansatz | PSA bei Diagn./ PSA bei Therapie | Histopathologische Untersuchung |
|-------------|--------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 12 | 06.01.2014 | D: 6,68 ng/ml OP: 6,49 ng/ml | Gleason 4+3=7b pT3a, pN0, R0 |

Der Zeitraum zwischen Entnahme der Prostata und Zuschnitt des Resektates in der Pathologie lag zwischen 1-5 Stunden. Die Ausmaße der separierten Gewebestücke waren abhängig von der Tumorgroße und betrugen zwischen 0,5-1 cm im Durchmesser, bei einer Dicke zwischen 0,5-2 mm. Es konnten maximal zwei dieser Gewebestücke herausgeschnitten werden, um eine nachfolgende histopathologische Befundung des Tumors nicht zu beeinträchtigen.

Nach den folgenden Filtrations- und Zentrifugationsschritten wurden die einzelnen Fraktionen in die jeweiligen Vertiefungen der 6-well ultralow attachment Mikrotiterplatte überführt.

Mikroskopisch zeigten sich schon zu Beginn verschiedene Sphäroid-Formationen, wobei die Ränder der Sphäroide in den Wells mit den kleinsten Gewebestückchen rundlicher waren. In der Hellfeld-Mikroskopie waren die einzelnen Zellen innerhalb eines Sphäroids abgrenzbar. In den 100 µm Wells waren teilweise noch scharfe unregelmäßige Kanten am Rande eines Sphäroids zu erkennen, entsprechend den Schnitträndern der Skalpell-Zerkleinerung (Abb. 5).

Nach einigen Tagen nahmen die Sphäroide der „Single Wells“ an Größe zu. Zudem war ein Zusammenschluss einzelner Sphäroide zu beobachten. Die initial größeren Sphäroide aus den 40µm und 100µm Wells schienen sich bei längerer Kultivierung hingegen zu verdichten. Dies hatte zur

Folge, dass sich die Sphäroide der unterschiedlichen Wells über die Zeit hinweg tendenziell sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrer Größe angleichen (Abb. 6).

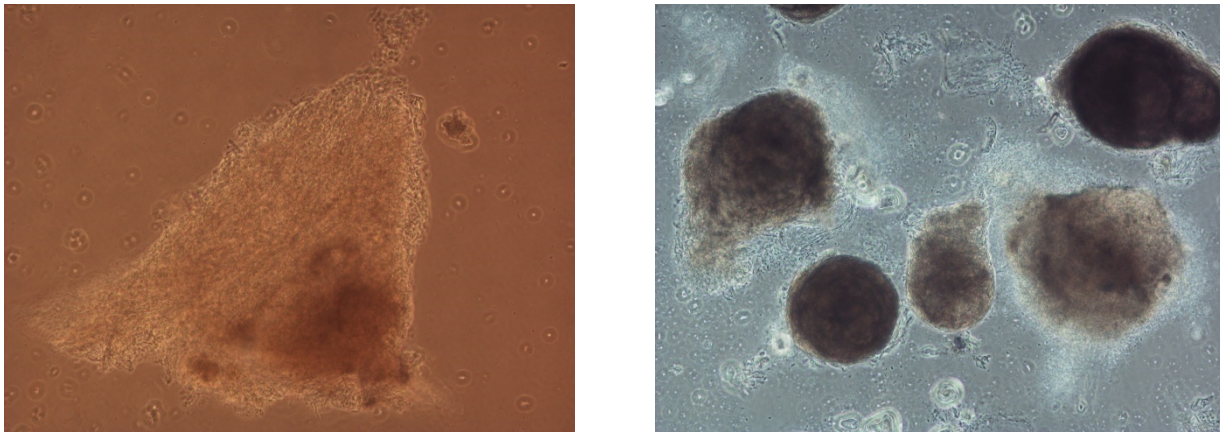
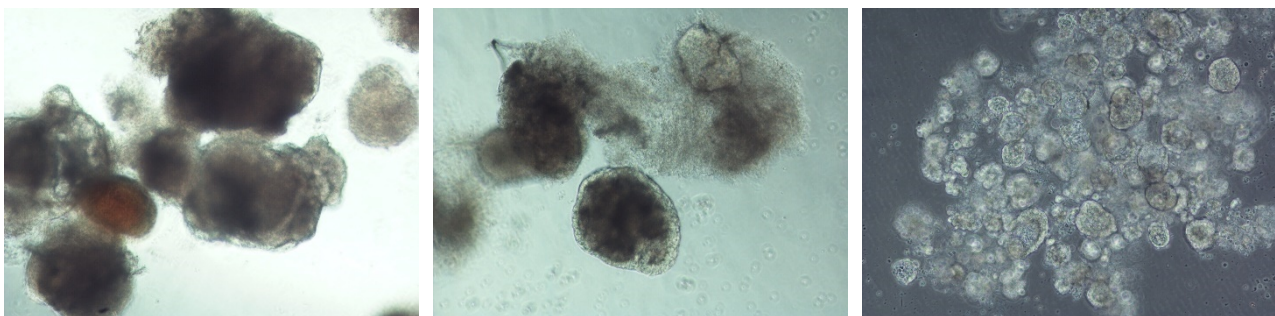


Abbildung 5: *Primärkultur-Sphäroide zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung. Das linke Bild zeigt ein Gewebefragment, bei dem noch die Schnittkanten durch die Skalpell-Zerkleinerung nach 3-tägiger Kultivierung zu sehen sind. Im rechten Bild ist die Konsolidierung und Verdichtung des Gewebes zu teilweise kreisrunden Sphäroiden nach 3 Monaten Kultivierungszeit zu sehen. (Hellfeldmikroskopie mit 10facher Vergrößerung).*



„Stückchen 100“

„Stückchen 40“

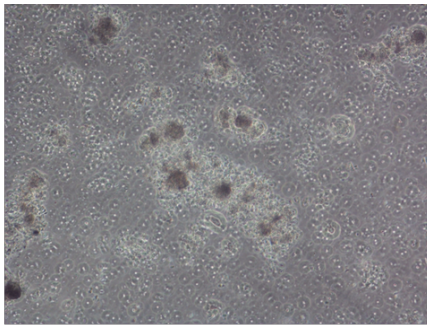
„Singles Cells“

Abbildung 6: *Morphologische Ergebnisse der Sphäroide des Patientenfalles 12 aus unterschiedlichen Wells, entsprechend den Filtergrößen 100µm und 40µm, sowie den Durchfluss beider Filter (Single Cells) nach einer Kultivierungszeit von 6 Wochen. (Hellfeldmikroskopie mit 10facher Vergrößerung).*

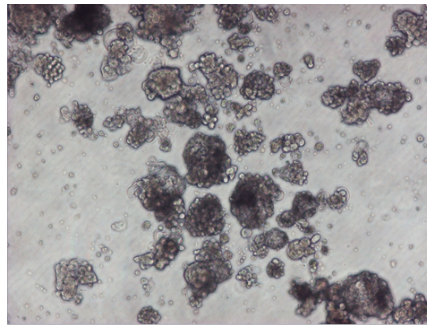
4.3 Kultivierung des primären Prostatagewebes

Nach einigen Wochen verdichteten und vergrößerten sich die Sphäroide. Im Randbereich größerer Sphäroide waren lichtmikroskopisch die Zellgrenzen sichtbar. Die zentralen Bereiche der größeren Sphäroide imponierten dunkel und einzelne Zellen waren nicht mehr abgrenzbar. Sobald mehrere Sphäroide dieses Stadium erreichten, wurden die Sphäroide passagiert. Die Zeitspanne bis zur Passagierung dauerte ca. 3

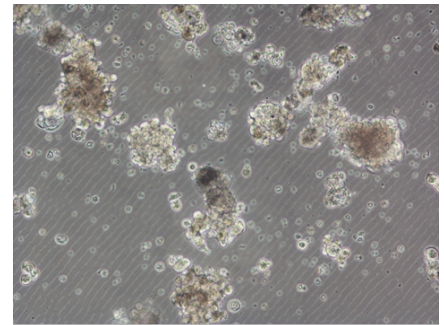
Wochen. Die genauen Passagierungszeiten wurden jedoch von Fall zu Fall individuell gewählt nach mikroskopischer Beurteilung der Sphäroide, sobald der zentrale Bereich innerhalb eines größeren Sphäroids stark verdichtet imponierte. Auf diese Weise konnten die Sphäroide über mehrere Monate hinweg in Kultur gehalten und ihre Morphologie beobachtet werden.



Tag 1

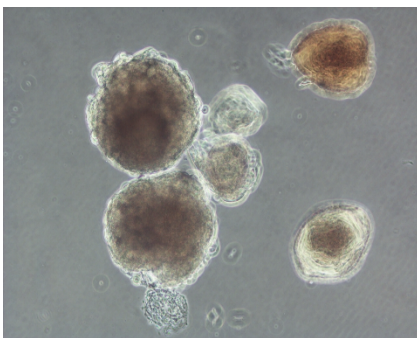


Tag 11

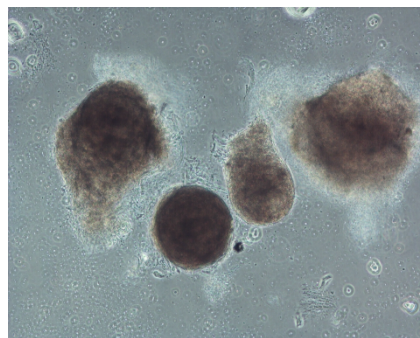


Tag 18

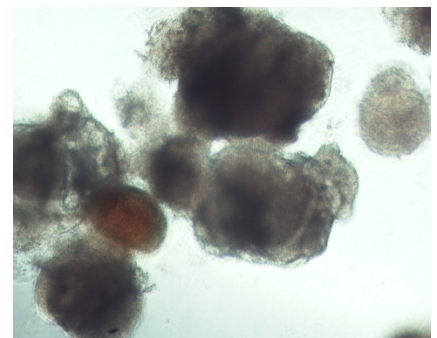
Abbildung 7: Sphäroide aus Fall 1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 1, 11 und 18). Zu sehen ist die Kondensierung und Vergrößerung der einzelnen Sphäroide. (Hellfeld-Mikroskopie mit 10-facher Vergrößerung)



Fall 5: 100µm Well nach 3-monatiger Kultivierungszeit



Fall 6: 100µm Well nach 4-monatiger Kultivierungszeit



Fall 12: 100µm Well nach 6-monatiger Kultivierungszeit

Abbildung 8: Sphäroide aus den Fällen 5, 6 und 12 nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten. (Hellfeld-Mikroskopie mit 10-facher Vergrößerung).

4.4 Hämatoxylin Eosin Färbung der Primärkultur

Zur weiteren Untersuchung der Morphologie, wurden einige Sphäroide der Fälle 2, 6 und 9 geerntet und in Paraffinblöcke eingebettet. Mittels Mikrotom wurden 4µm dicke Schnitte angefertigt und durch Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Die lichtmikroskopische Analyse zeigte eine rundliche Sphäroid-Struktur mit dicht gepackten Zellreihen im Randbereich sowie Zellanordnungen, die sich zum Zentrum des Sphäroids hin organisierten und den Sphäroid septierten (Abb.9). Der Hauptanteil im Zentrum des Sphäroids färbte sich eosinophil und enthielt wenige Zellen.

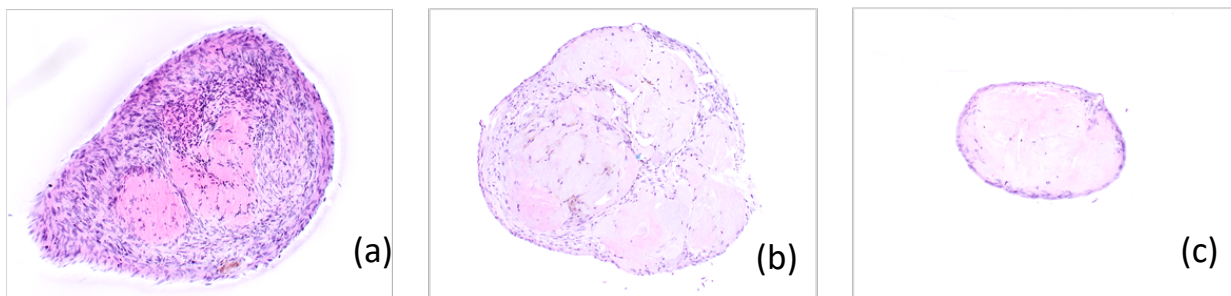


Abbildung 9: Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte der Fälle 2 (a), 6 (b) und 9 (c).

4.5 LIVE/DEAD® Cell Viability Assays zum Nachweis der Zellviabilität der Sphäroide

Die Formierung zu Sphäroiden und deren morphologische Veränderungen konnten über Wochen hinweg lichtmikroskopisch beobachtet und fotodokumentiert werden. Zum Nachweis vitaler Zellen wurde der LIVE/DEAD® Cell Viability Assay angewendet.

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration für die Substanzen CalceinAM und Ethidium-Homodimer wurde der Assay zunächst an LNCaP Monolayern durchgeführt. Es wurden die Konzentrationen 0,1µM, 1µM und 10µM getestet. Dabei ergab sich für LNCaP ein optimaler Verdünnungsfaktor von 1µM für beide Substanzen. Bei geringerer Konzentration waren die Zellen zu schwach fluoreszierend, in höherer Konzentration zeigte sich hingegen eine Überbelichtung (Abb. 10).

Der LIVE/DEAD® Cell Viability Assay wurde an den Fällen 1-8 angewendet. Hierfür wurden jeweils 100µl der zu untersuchenden Sphäroid-Suspension abpipettiert und dem Protokoll des Assays zugeführt. Es zeigte sich in allen untersuchten Fällen eine überwiegende Zahl grün fluoreszierender, also vitaler Zellen (Abb. 11). Eine sehr geringe Zahl rot fluoreszierender Zellen war ebenfalls bei einigen Sphäroiden, als Hinweis für avitale Zellen, abgrenzbar. Der Anteil vitaler Zellen unterschied sich zwischen den untersuchten Fällen nur gering, jedoch imponierte die Intensität der grünen Fluoreszenz. Fall 2 und 4 zeigten die stärkste Fluoreszenz, während Fall 1 und 3 bei gleicher Belichtung eine etwas schwächere Intensität zeigte.

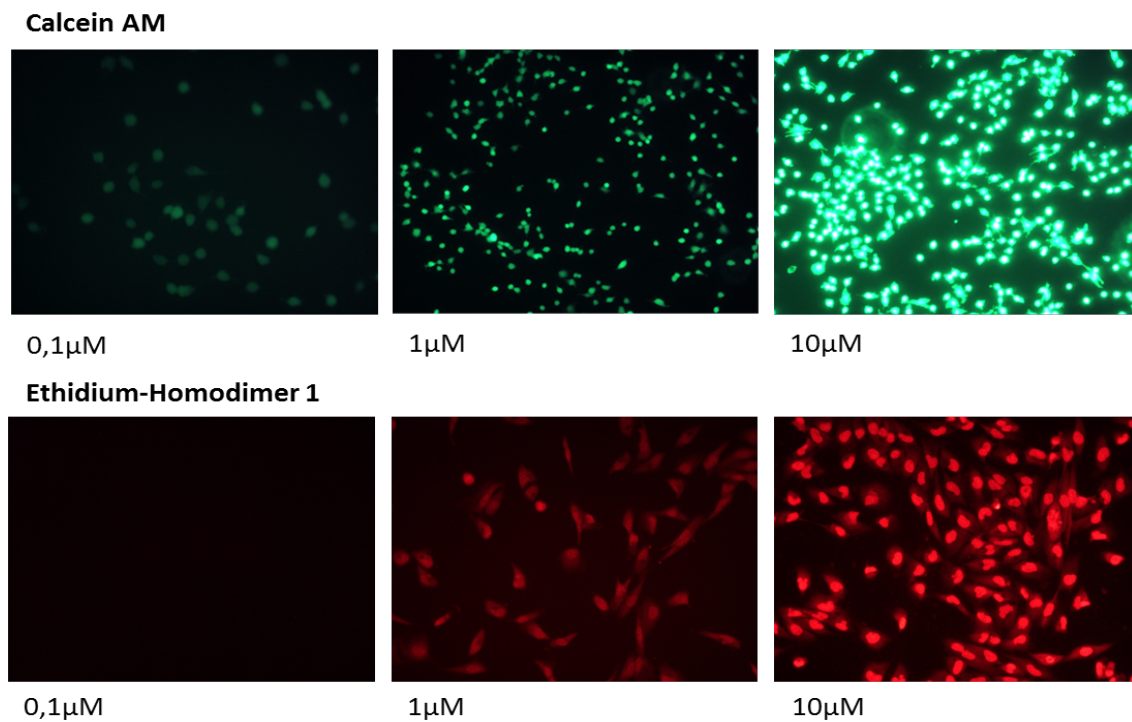


Abbildung 10: LIVE/DEAD® Cell Viability Assays, angewendet an der Zelllinie LNCaP unter Verwendung verschiedener Konzentrationen für Calcein AM und Ethidium Homodimer-1. Die besten Ergebnisse zeigten sich bei einer Konzentration von 1μM.

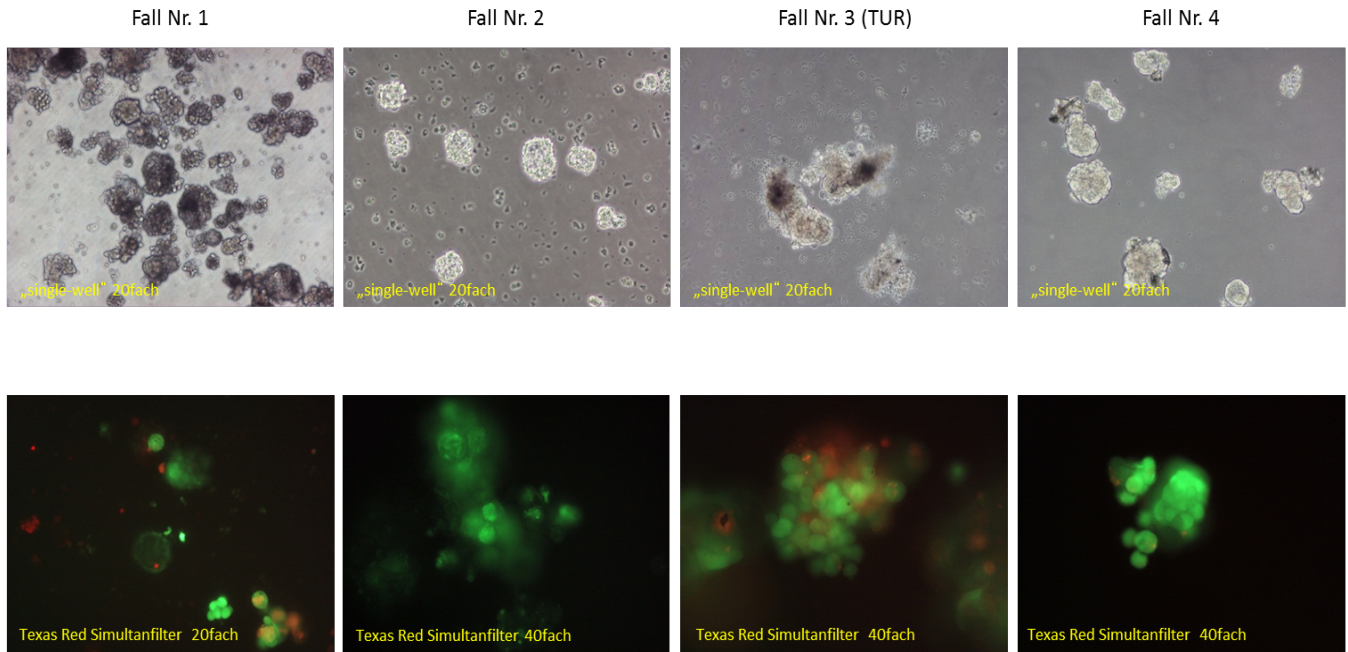


Abbildung 11: LIVE/DEAD® Cell Viability Assay der Fälle 1-4. In der oberen Bildreihe sind die Sphäroide lichtmikroskopisch dargestellt. Darunter jeweils die entsprechenden Fälle in der Fluoreszenzmikroskopie. Grün fluoreszierende Zellen entsprechen vitalen Zellen, während die rot fluoreszierenden Zellen avital sind.

4.6 Immunzytochemische Färbung von Einzelzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zunächst bestand die Herausforderung darin, eine Färbemethode zu etablieren, um das limitierte Zellmaterial der Primärkultur für eine fluoreszenzmikroskopische Phänotypisierung aufzuarbeiten. Hierfür sollten die Sphäroide mittels Trypsin/EDTA Verdau vereinzelt und im Anschluss auf Objektträgern fixiert werden.

Es wurden Vorversuche anhand von LNCaP-Sphäroiden, durchgeführt, um sowohl die Vereinzelung der Sphäroide als auch die anschließende Fixierung der Zellen auf Objektträgern zu erproben. Die Vereinzelung der LNCaP-Sphäroide mittels Trypsin/EDTA Verdau war problemlos möglich. Für die anschließende Fixierung auf Objektträgern wurden verschiedene Verfahren getestet (Auftropfen auf Objektträger, Suspensionsfärbung, Fixierung mittels Zytospin) bis es schließlich gelang, eine stabile Fixierung der Zellen auf Objektträgern zu erreichen.

Die „Auftropf-Methode“, bei der die Zellsuspension auf Objektträgern aufgetropft und dann gefärbt wurde, wie auch die Suspensionsfärbung, bei der die Färbung schon innerhalb der Zellsuspension erfolgte, erwiesen sich für das limitierte Zellmaterial der Primärkultur als unpraktikabel, da ein Großteil der Zellen während der einzelnen Färbeschritte vom Objektträger abgeschwemmt wurde.

Dieses Problem konnte behoben werden, indem die Zellsuspension mittels Zytospin bei einer Umdrehung von

400/min über 5 min auf den Objektträgern fixiert wurde. Hierbei war eine deutlich stabilere Adhäsion der Zellen am Objektträger zu beobachten, sodass die Zellen während der Färbung haften blieben.

Die immunzytochemischen Färbungen der Marker CK-5, CK-8, AR und Ki67 wurden zunächst an den permanenten Zelllinien LNCaP und DU-145 getestet, um geeignete Verdünnungsfaktoren für die verwendeten Antikörper festzulegen. Dabei ergaben sich die besten Signale bei Verdünnungsfaktoren von 1:200 für die Primärantikörper und 1:400 für den verwendeten Sekundärantikörper Cy3 (Abb. 12).

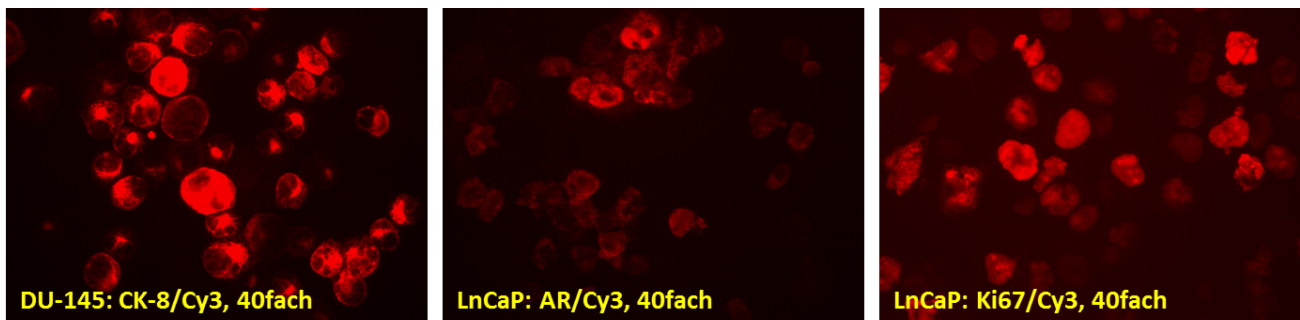


Abbildung 12: Immunzytochemische Analyse der Expression von CK-8, AR und Ki67. CK-8 Expression wurde an der Zelllinie DU-145 durchgeführt, AR und Ki67-Expression an der Zelllinie LNCaP. (Fluoreszenzmikroskopie in 40facher Vergrößerung).

Die immunzytochemische Färbung der Primärkultur für die Marker CK-5, CK-8, AR und Ki67 wurde an den Patientenfällen 5-8, sowie 10 und 11 durchgeführt. Bei allen untersuchten Fällen waren 10-30% der Zellen positiv für den Luminalzellmarker CK-8. Der Basalzellmarker CK-5 war in den Fällen 6 und 7, sowie 10 und 11 positiv, jedoch nur bei 10-15% der Zellen. Die Fälle 5 und 8 zeigten keine Expression von CK-5.

Die Marker AR und Ki67 ergaben wesentlich schwächere Signale. Auch war ein deutlich geringerer Anteil der Zellen positiv für diese Marker. Fall 5 zeigte mit ca. 5% die größte Anzahl Androgenrezeptor-positiver Zellen. Bei den übrigen Fällen war nur eine geringe Zahl von ca. 1% der Zellen positiv für den Androgenrezeptor. Bei Fall 5 und 6 befanden sich ca. 3% der Zellen in Teilung, d.h. sie zeigten positive Signale für Ki67. Bei den Fällen 8, 10 und 11 konnte keine Proliferation durch Ki67 Färbung nachgewiesen werden.

In Tabelle 8 sind die o.g. Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie für die untersuchten Expressionsmarker zusammengefasst. Die zugehörigen fluoreszenzmikroskopischen Bilder sind im Anschluss (Abb. 13 und 14) dargestellt.

Tabelle 8: *Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Expression von CK-5, CK-8, AR und Ki67.*
Die Prozentangaben ergeben sich aus dem Anteil der fluoreszenzmikroskopisch positiven Zellen, gezählt pro Objektträger.

| Fall Nr. | CK-5 Anteil positiver Zellen | CK-8 Anteil positiver Zellen | AR Anteil positiver Zellen | Ki67 Anteil positiver Zellen |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 5 | negativ | 20% | 5% | 3% |
| 6 | 10% | 25% | 1% | 3% |
| 7 | 10% | 20% | 1% | 1% |
| 8 | negativ | 20% | 1% | negativ |
| 10 | 15% | 10% | 1% | negativ |
| 11 | 15% | 30% | 1% | negativ |

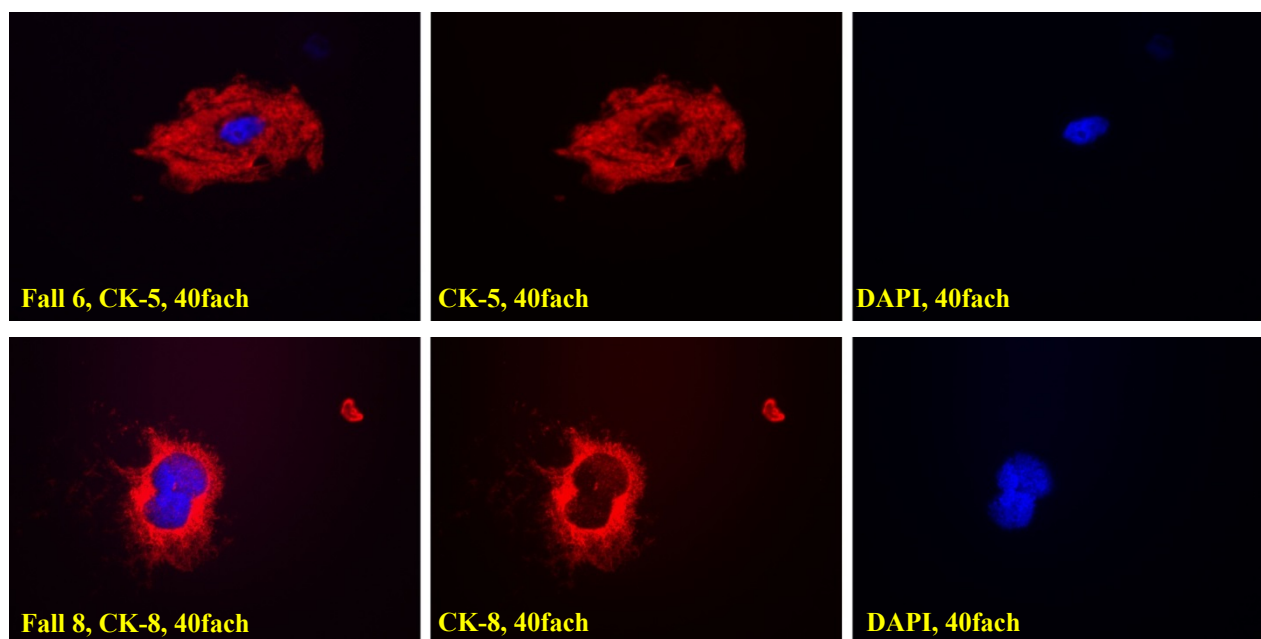


Abbildung 13: *Immunzytochemische Analyse der Expression von CK-5 des Falls 6 (obere Bildreihe) und CK-8 des Falles 8 (untere Bildreihe). Das linke Bild ist eine Überlagerung der beiden anderen Bilder. Der Zellkern ist mit DAPI (Blau) eingefärbt. Deutlich zu sehen ist das CK-Signal im Bereich des Zytoplasmas, der Zellkern ist ausgespart. (Vergrößerung 40fach).*

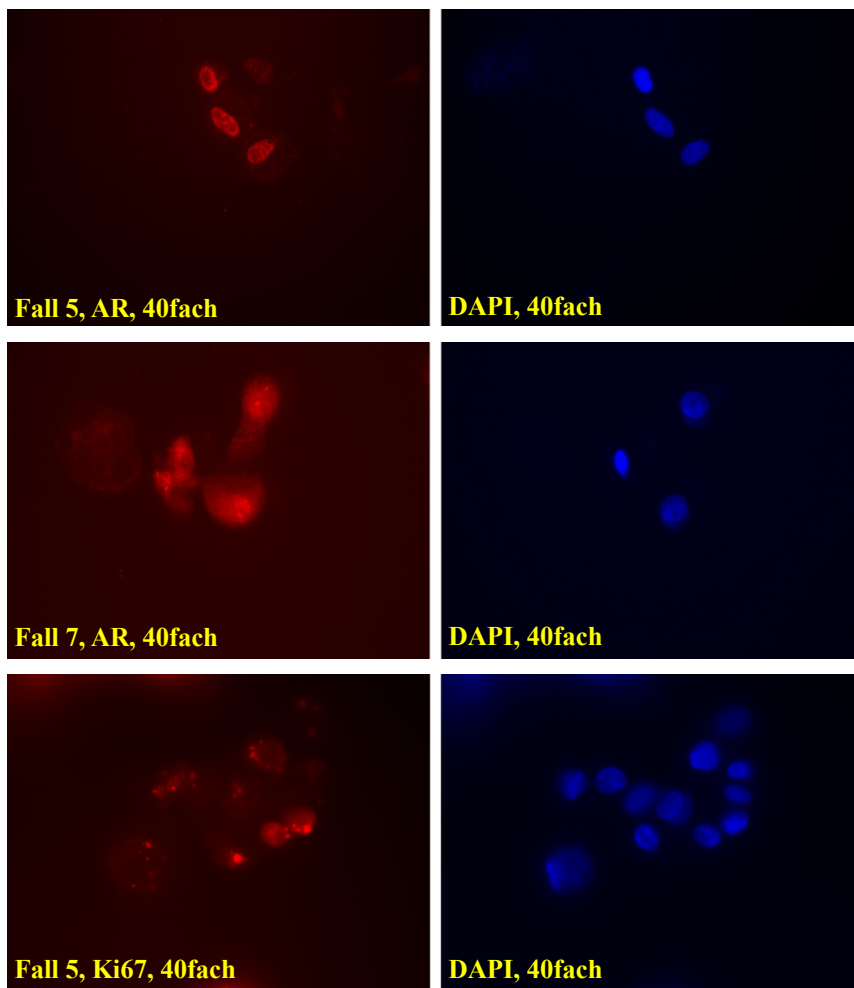


Abbildung 14: Immunzytochemische Analyse der Expression des nukleären Androgenrezeptors (Reihe 1 und 2), sowie von Ki67 (Reihe 3,) Fälle 5 und 7. Rechts sind die Zellkerne mit DAPI (Blau) eingefärbt, links ist die Darstellung des AR und von Ki67 zu sehen. (Vergrößerung 40fach).

4.6.1 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten aus LNCaP Sphäroiden

Nach der immunzytochemischen Färbung der Zellen, welche zuvor als Zellsuspension mittels Zytospin auf Objektträger fixiert wurden, sollte als nächster Schritt eine Antikörperfärbung von Paraffinschnitten durchgeführt werden. Auch hierfür wurde das Protokoll zunächst anhand von Sphäroiden der LNCaP Reihe etabliert, um Konzentrationen für Antikörper zu testen und das Färbeprotokoll zu erproben.

Die Antikörperkonzentrationen, welche bei den Färbungen der Einzelzellen verwendet wurde, eigneten sich auch für die Paraffinschnitte. So wurde ebenfalls eine Konzentration von 1:200 für den primären und 1:400 für den Sekundärantikörper verwendet. Die Zelllinie LNCaP zeigte eine Expression des Androgenrezeptors sowie des Proliferationsmarkers Ki67, wohingegen CK-8 beim untersuchten Paraffinschnitt nicht dargestellt werden konnte (Abb. 15).

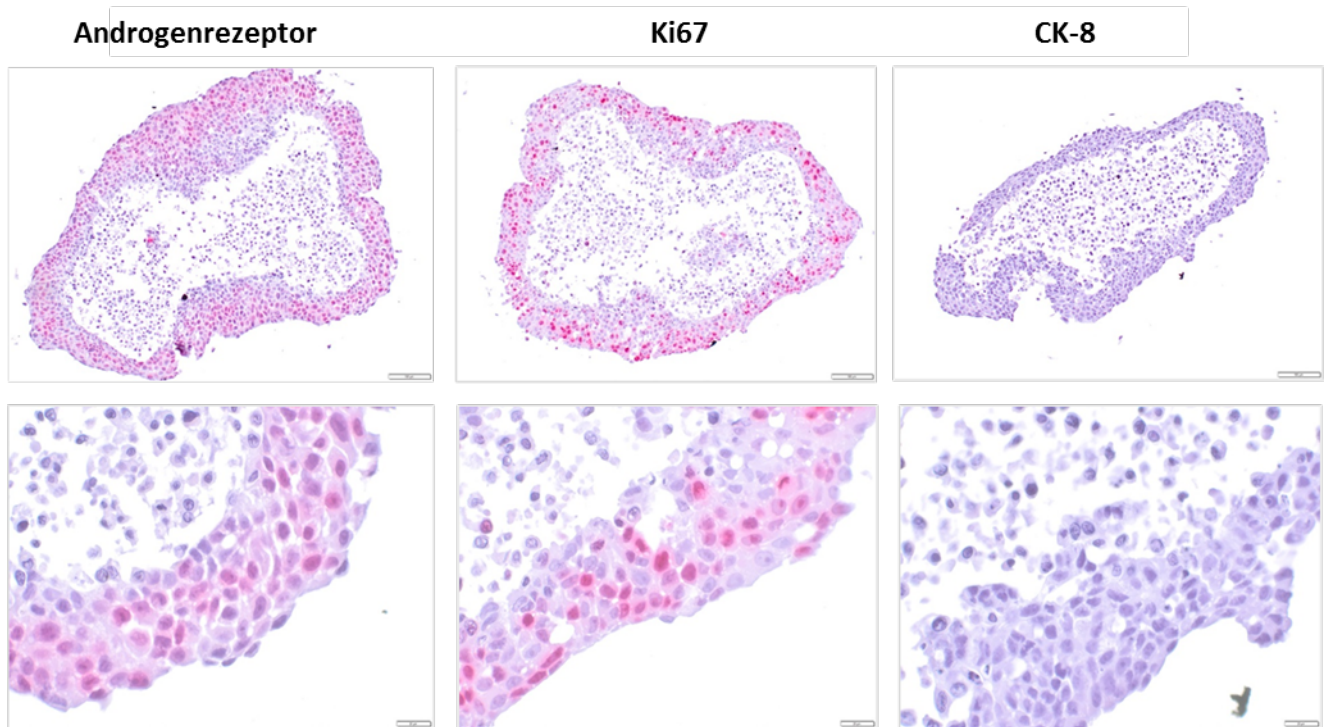


Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung der Expression des AR, von Ki67 und CK-8 an Paraffinschnitten, welche aus Sphäroiden der LNCaP Reihe angefertigt wurden. In der oberen Reihe 10fache Vergrößerung, darunter repräsentative Ausschnitte in 40facher Vergrößerung.

4.6.2 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten aus primären Sphäroiden

In der Folge wurde die immunhistochemische Analyse der Expression von CK-5, CK-8, des AR und Ki67 an Paraffinschnitten aus primären Sphäroiden durchgeführt. Hierfür wurden die initial hergestellten Paraffinschnitte von Fall 2 verwendet. In der Hellfeldmikroskopie zeigten sich dabei nur schwache Signale für die untersuchten Marker. Insbesondere der Androgenrezeptor aber auch CK-5 und 8 kamen nur sehr schwach zur Darstellung. Einzelne Zellen waren hingegen deutlich positiv für den Proliferationsmarker Ki67 (Abb. 16 und 17).

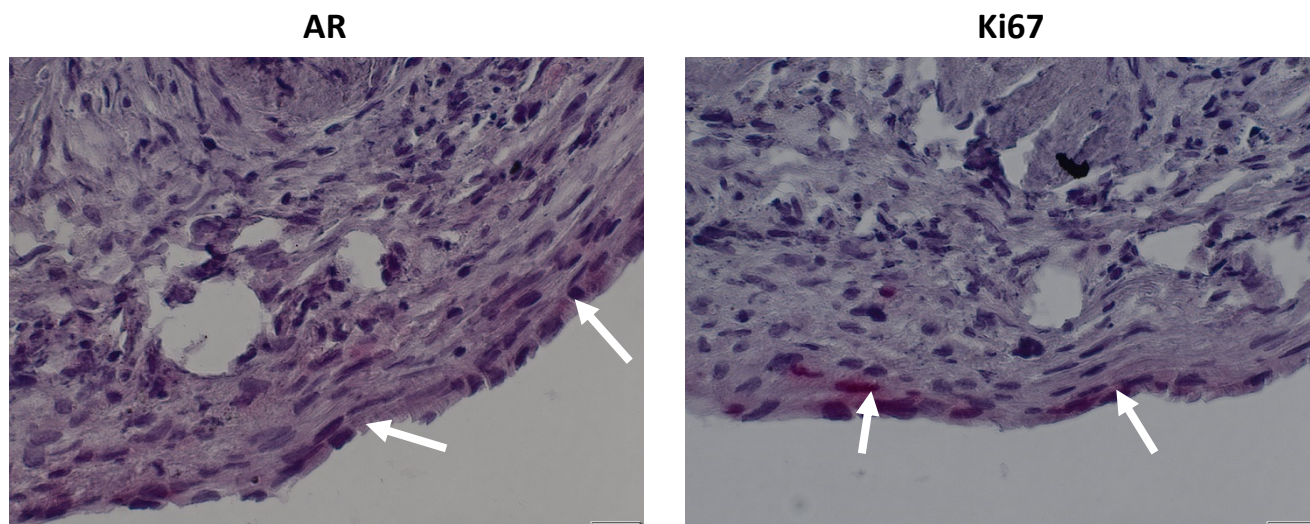


Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse der Expression des AR, Ki67, an Paraffinschnitten, welche aus Fall 2 gewonnen wurden. Repräsentative Ausschnitte in 40facher Vergrößerung.

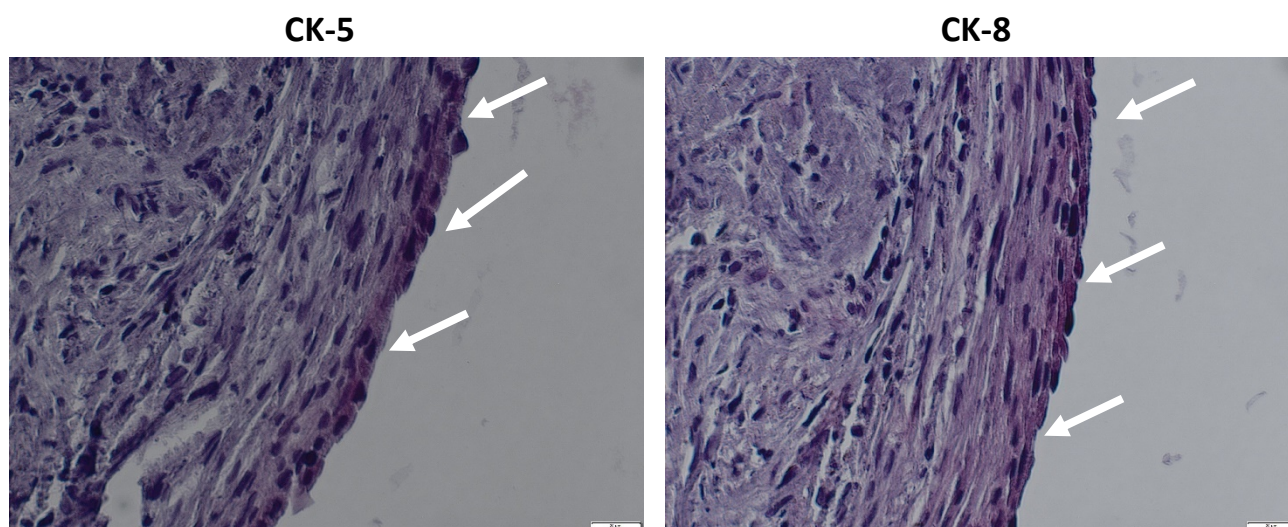


Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse der Expression von CK-5 und CK-8 an Paraffinschnitten, welche aus Fall 2 gewonnen wurden. Repräsentative Ausschnitte in 40facher Vergrößerung.

4.7 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)

Nachdem eine Phänotypisierung der Primärkultur anhand einiger Marker mittels Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskopie gelungen war, sollte das Proliferationsverhalten der Sphäroide untersucht werden. Hierfür kam der CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) zum Einsatz. Um das limitierte Zellmaterial der Primärkultur zu schonen und die Durchführbarkeit an Sphäroidkulturen zu erproben, wurde der Proliferationsassay zunächst anhand der Zelllinie LNCaP (Sphäroide) getestet.

Die Zellzahlen der LNCaP Reihe wurden im Hinblick auf das limitierte Primärmaterial niedrig gehalten. Es wurde Triplicates zu 3000, 4500 und 6000 Zellen ausgesät und an den Tagen 1,3 und 5 ausgelesen. Für die Zellzahlen 4500 und 6000 zeigte LNCaP eine stetige Proliferation, lediglich das Triplicate, welches 3000 Zellen enthielt, zeigte von Tag 3 zu Tag 5 eine rückläufige Zellzahl (Abb. 18).

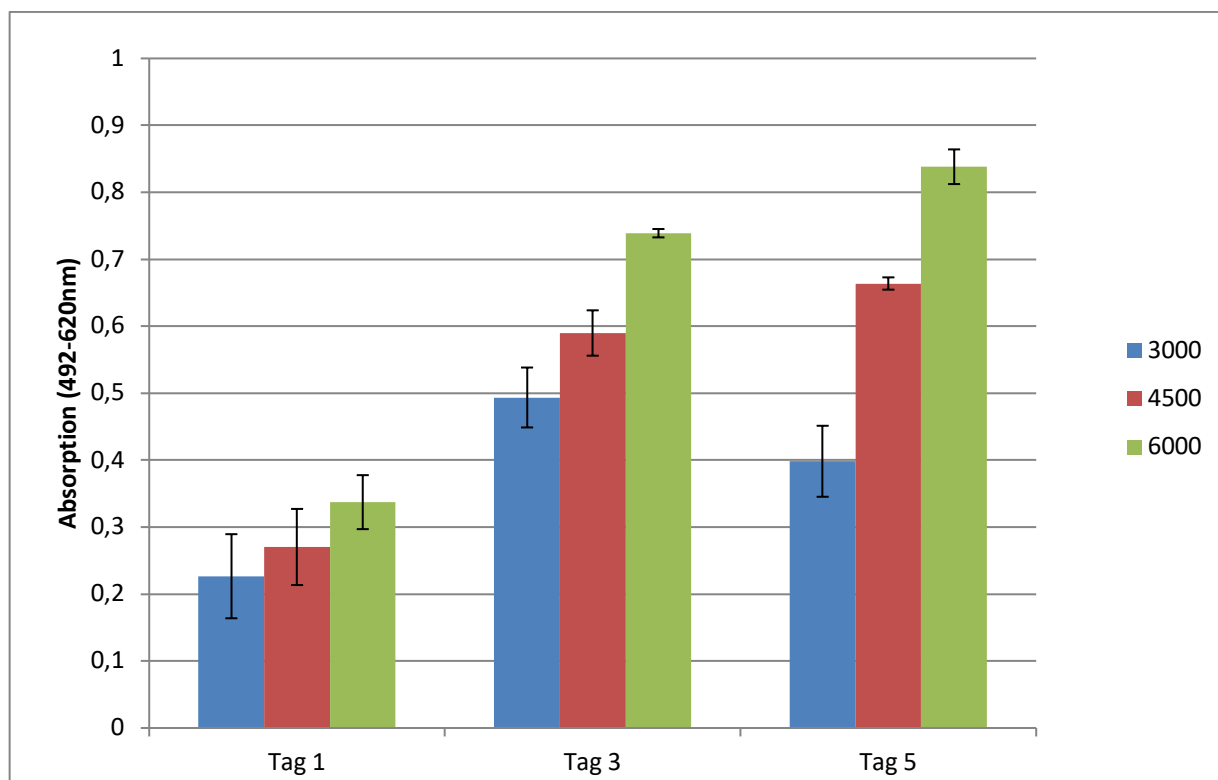


Abbildung 18: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) für die Zelllinie LNCaP. Die Zellen wurden in Triplicates mit den Zellzahlen 3000, 4500 und 6000 ausgesät. Ausgewertet wurde die Proliferation an den Tagen 1, 3 und 5.

Nachdem Mittels CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) eine Proliferation der Zelllinie LNCaP gezeigt werden konnte, wurde der Assay auf die Primärkultur übertragen. Es wurden höhere Zellzahlen als bei LNCaP gewählt, um eine Sphäroidbildung während der Inkubationszeit besser zu ermöglichen. Für den Assay wurden Sphäroide aus Fall 12 verwendet, da bei diesem Patientenfall ausreichend Zellmaterial zur Verfügung stand. Die Sphäroide wurden mittels Trypsin/EDTA so vereinzelt, dass eine

Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer möglich war. Die Zellzahl ergab die Möglichkeit 3x2 Triplicates zu 10000 und 15000 Zellen auszusähen, sodass eine Auswertung der Proliferation an 3 Zeitpunkten durchgeführt werden konnte. Ausgewertet wurde die Proliferation an den Tagen 1, 4 und 7.

Als Negativkontrolle wurde auf jeder Platte ein Triplicate mit nur Medium befüllt.

Für die Wells mit 10000 Zellen zeigte sich von Tag 1 zu Tag 4 eine leichte Proliferation, von Tag 4 zu Tag 7 war die Zellzahl konstant, bzw. kein signifikanter Rückgang der Zellzahl zu beobachten (Abb. 19).

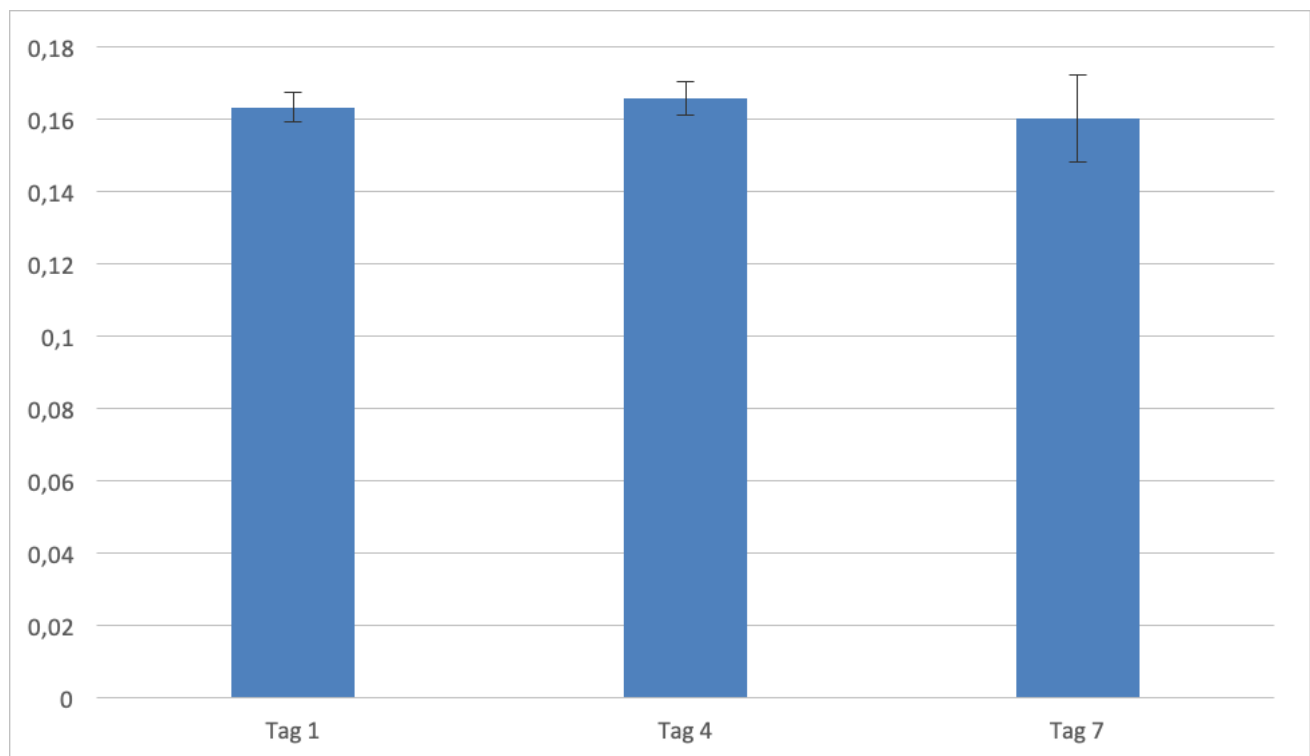


Abbildung 19: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Fall 12). Die Zellen wurden in Triplicates mit je 10000 Zellen ausgesät. Es zeigt sich von Tag 1 zu Tag 4 eine leichte Proliferation mit dann konstantem Vitalitätsnachweis.

5 Diskussion

Bei vielen Tumorentitäten konnten in vitro Modelle, welche sowohl aus lokalisierten malignen Neoplasien wie auch aus Tumormetastasen generiert wurden, erfolgreich etabliert werden. Die Expansion des Zellmaterials und die Aufrechterhaltung von Langzeitkulturen über viele Passagen hinweg ist bei vielen dieser in vitro Modelle problemlos möglich. Zudem sind unterschiedliche Modalitäten der Kultivierung, sei es als Monolayer oder in Form von 3-dimensionalen Sphäroiden, gängige Praxis und zuverlässig umsetzbar. Es konnte gezeigt werden, dass eine gute Vergleichbarkeit dieser in vitro Modelle mit den Karzinomen, die sie repräsentieren sollen, besteht. Daher konnten durch systematische Analyse des in vitro Zellmaterials Erkenntnisse über das Wachstumsverhalten gewonnen und neue therapeutische Ansatzpunkte gefunden werden (Elliot et al 2011).

Auch für das Prostatakarzinom wäre die Verfügbarkeit eines in vitro Modells, welches in der Lage ist, das intraprostatische Adenokarzinom abzubilden und seine Progression zu fortgeschrittenen Tumorstadien zu verfolgen, außerordentlich wünschenswert. Allerdings hat sich die in vitro Kultivierung von Zellmaterial über die letzten Jahrzehnte hinweg als ausgesprochen problematisch erwiesen (Young et al., 2013).

Dies hängt mit speziellen Eigenschaften des Prostatakarzinoms zusammen, welche offensichtlich einer in vitro Kultivierung erschweren. Dazu gehört das vergleichsweise langsame Wachstum, die starke Abhängigkeit der Zellen von ihrer Zellumgebung sowie die ausgesprochene Heterogenität dieses Karzinoms (Berger et al., 2011).

Im urologischen Forschungslabor der Universität Homburg/Saar wird seit Jahrzehnten an der Kultivierung von primärem Prostatamaterial geforscht. Dadurch konnte ein großer Erfahrungsschatz gewonnen werden, auf den bei der Etablierung des hier vorgestellten Zellkulturverfahrens zurückgegriffen werden konnte.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert werden und dabei eine Auseinandersetzung mit bereits publizierter Literatur stattfinden.

Ausgehend von den Erkenntnissen der Forschungsgruppe um Donna Peehl et al. (Young et al., 2013), zu denen die permanente Beibehaltung von Zell-Zell Interaktionen sowie die Zugabe sog. „small molecules“ zur Verstärkung von Zell-Zell Interaktionen gehören, konnten wir zeigen, dass unser Sphäroidmodell ebenfalls eine Kultivierung, Passagierung und Expansion von Primärmaterial des Prostatakarzinoms ermöglicht (Saar et al., 2014).

Nach entsprechenden Vorversuchen ist es gelungen, das Tumormaterial aus 12 Patientenfällen zu gewinnen, aufzuarbeiten und in eine in vitro Sphäroidkultur zu überführen. Das Zellmaterial konnte über mehrere Passagen hinweg kultiviert werden. In allen Fällen konnte die Vitalität des Zellmaterials auch nach Monaten der Kultivierung nachgewiesen werden. Das Zellmaterial wurde durch Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Dabei konnten wir die Oberflächenmerkmale CK-5 und CK-8 sowie den Androgenrezeptor und den

Proliferationsmarker Ki-67 nachweisen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Expansion des Zellmaterials möglich ist.

Gewinnung und Aufbereitung des Zellmaterials

Die mechanische Zerkleinerung des Gewebes und der anschließende limitierte Collagenaseverdau gestalteten sich mit dem Primärmaterial problematisch, da Teile des primären Gewebes eine relativ hohe Festigkeit aufwiesen und der Vorgang des Gewebeverdaus dadurch relativ viel Zeit in Anspruch nahm. Es muss angenommen werden, dass das Zellmaterial zwischen dem Zeitpunkt der intraoperativen Unterbrechung der Blutzufuhr über die Aufbereitung bis hin zur Überführung in das Verdaumedium gefährdet ist, sodass diese Phase möglichst kurz gehalten werden sollte.

Möglicherweise war die Festigkeit der LuCaP Xenografttumore im von Young und Saar et al. beschriebenen Protokoll (Young et al., 2013) geringer, wodurch der limitierte Verdau rascher vonstattenging.

Die höhere Gewebefestigkeit des Primärmaterials hat jedoch den Vorteil, dass die Gefahr einer zu starken Dissoziation des Gewebes zu Einzelzellen geringer ist. Dadurch können Zell-Zell Kontakte sicher beibehalten werden.

Durch Optimierung der logistischen Abläufe ist es gelungen, den Zeitraum zwischen Prostatektomie, Transport, Gewebeentnahme und Aufbereitung im Labor zwischen 4 bis max. 6 Stunden zu halten. Der Vitalitätsnachweis über mehrere Monate hinweg zeigt, dass dieser Zeitraum nicht zu lange gewählt wurde. Trotzdem sollte bei der Weiterentwicklung des Verfahrens nach Methoden der mechanischen und enzymatischen Gewebeaufspaltung gesucht werden, die eine schnellere und schonendere Fragmentierung des Gewebes erlauben. Gleichzeitig muss aber auch eine zuverlässige Unterbrechung der Zellvereinzelung möglich sein, um ausreichend Zell-Zell Kontakte zu erhalten. Dadurch könnte das ohnehin geringe Zellmaterial während der Gewebeaufspaltung besser geschont und möglichst viele vitale Zellen in Kultur überführt werden (Georges et al., 2002).

Durch die Anwendung der Methoden der Gewebeprozessierung beobachteten wir nach Überführung des Zellmaterials in das Kulturmedium unter Zugabe der o.g. Substanzen eine rasche Formierung 3-dimensionaler Sphäroide.

In der Literatur sind verschiedene Techniken der in vitro Kultivierung des Prostatakarzinoms beschrieben, für welche jeweils Vor- und Nachteile erörtert werden können.

Die Verfahren unterscheiden sich zum einen im räumlichen Wachstumsverhalten (2-dimensional vs. 3-dimensional) sowie in der Art der Zusammensetzung der Zellen (Monokulturen/Kokulturen/Heterosphäroide). Zweidimensionale Zellkultursysteme haben den Vorteil, dass ein vergleichsweise geordnetes Wachstum der Zellen durch die Adhäsion an der Zellkulturflasche stattfindet. Die räumliche Ausbreitung bei Zellproliferation ist vorgegeben. Dadurch sind die Umgebungsbedingungen und die Nährstoffverfügbarkeit für alle Zellen weitgehend identisch. Die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse über verschiedene

Versuchsreihen hinweg ist somit gut.

Bei 3-dimensionalen Verfahren ist es kaum möglich, Sphäroide in gleicher Zahl und Größe zu generieren. Jedoch können Sphäroide ihrer Größe nach sortiert werden. Damit wird eine vergleichende Analyse unterschiedlicher Größen möglich.

Die unterschiedliche Größe hat beispielweise Einfluss auf die Penetrationsfähigkeit verschiedener Reagenzien, denen die Zellen innerhalb der Sphäroide im Rahmen der Kultivierung oder während Zellkulturassays ausgesetzt sind. Die Verfügbarkeit des Nährmediums ist von der Größe der Sphäroide abhängig sowie von der räumlichen Position einzelner Zellen innerhalb des Sphäroids (Kunz-Schughart, Freyer, Hofstaedter, & Ebner, 2004). In unserem Protokoll wird eine Subfraktionierung unterschiedlich großer Sphäroide durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass dadurch ein permanenter Vergleich der unterschiedlich großen Sphäroide in Bezug auf Morphologie, Viabilität, Nekroseanteil, Zelltypenverteilung etc. vorgenommen werden kann. So kann der Einfluss der Sphäroidgröße und damit der Anteil der Zell-Zell Verbindungen und des Microenvironment zu beliebigen Zeiträumen während der Kultivierung vergleichend untersucht und beurteilt werden. Dies könnte wichtige Erkenntnisse über vorherrschende Zelltypen und deren Dynamik im Zuge der Progression sowie die Veränderung von Rezeptoren, wie z.B. des Androgenrezeptors, liefern.

Die 3-dimensionale Struktur bildet die Situation im lokalisierten oder metastasierten Karzinom deutlich realitätsnäher ab. Sowohl im primären Tumorgewebe wie auch im Sphäroid wird ein ständiger Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt, der durch Hypoxie, Gewebeazidose und Nährstoffmangel entsteht (Rodriguez-Enriquez et al., 2008). Die Biologie der Tumorzellen wird dadurch entscheidend beeinflusst. Entsprechend den Erfordernissen passen Tumorzellen ihren Zellzyklus und Metabolismus den Umweltbedingungen an, indem sie je nach Notwendigkeit (Nährstoffangebot, Hypoxie, räumliche Expansionsmöglichkeit) Gene hoch oder herunterregulieren. Für die Zellkultur bedeutet dies, dass ein starker Unterschied des Energiemetabolismus, des Proliferationsverhaltens und der Genexpression besteht, je nachdem, ob die Zellen als Monolayer oder in Form von Heterosphäroiden kultiviert werden (Kim, 2005; Kunz-Schughart et al., 2004; Kurioka et al., 2012; O'Connor, 1999; Rodriguez-Enriquez et al., 2008).

Das Tumorstroma, also das „Microenvironment“ das die Tumorzellen umgibt, ist entscheidend an der Karzinogenese beteiligt. Ein aussagekräftiges in vitro Tumormodell sollte dieses beinhalten, damit die am Modell gewonnenen Erkenntnisse auf den Primärtumor übertragen werden können (Hoarau-Véhot et al., 2018; R. Taylor & Risbridger, 2008). Somit könnte ein 3-dimensionales Heterosphäroidmodell das Prostatakarzinom besser imitieren als die bisher häufig verwendeten und aus Metastasen generierten 2-dimensionalen Monolayerkulturen (Karthaus et al., 2014; Kurioka et al., 2012).

Die 2-dimensionale Kultivierung von lokal begrenzten Prostatakarzinomen ist bisher nicht möglich. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die stark veränderte Mikroarchitektur gegenüber 3-dimensionalen Kultivierungsmodellen sein, die letztlich die Viabilität einer Primärkultur des Prostatakarzinoms verhindert (Batzler et al., 2008). Die Lösung dieses Problems kann in der Sphäroidkultur gefunden werden. Die

Neuerungen der in vitro Forschung, welche im Sphäroidmodell von Young und Saar et al. berücksichtigt wurden und anhand von LuCaP Xenografttumoren zum Erfolg führten, basieren auf der Beibehaltung und Verstärkung von Zell-Zell Interaktionen.

Bereits Kondo et al., die sich mit Zellkultursystemen kolorektaler Karzinome befassten, konnten zeigen, dass die ständige Beibehaltung von Zell-Zell Kontakten erforderlich ist, damit die Überführung von Tumorgewebe in eine Zellkultur gelingt und die Viabilität der Zellen aufrechterhalten bleibt. Bei der Gewebeaufbereitung wurde das Tumorgewebe durch limitierten Verdau nur teilweise dissoziiert, sodass Zellcluster bestehen blieben, innerhalb derer die Zell-Zell Kontakte niemals vollständig aufgehoben sind. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Zellcluster in einer Suspension zu Sphäroiden formierten. Sie wurden als „cancer tissue-originated spheroids“ (CTOSs) bezeichnet. Das Zellüberleben bei diesem Kultivierungsverfahren wird auf die Beibehaltung von E-Cadherin vermittelten Zell-Zell Interaktionen, unterstützt durch AKT Aktivierung, zurückgeführt. E-Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die eine Stabilisierung von Zell-Zell Kontakten bewirken und an Signaltransduktionen beteiligt sind (Gumbiner, 2005). AKT wiederum ist eine Serin/Tyrosin Kinase mit zentralem Einfluss auf Proliferation, Zellzyklus und Stoffwechsel (Manning & Cantley, 2007). Die Sphäroide von Kondo et al. wiesen eine hohe Zellviabilität auf. Darüber hinaus ist es gelungen, die CTOs als Xenografttumore anwachsen zu lassen, sodass diesem in vitro Modell auch ein in vivo Xenograftmodell zur Seite gestellt werden konnte (Kondo et al., 2011). Der Einfluss von Zell-Zell Interaktionen epithelialer Zellen auf das Zellüberleben bzw. die Apoptoseeinleitung bei Aufhebung des Kontaktes wurde schon in früheren Arbeiten beschrieben (Frisch & Francis, 1994). Aus unseren Ergebnissen, basierend aus den Erkenntnissen von Kondo et al., kann geschlossen werden, dass der überschaubare Erfolg vieler in vitro Ansätze zur Kultivierung von Prostatakarzinomzellen auf zwischenzeitlich unterbrochene Zell-Zell Interaktionen zurückgeführt werden könnte. In vielen Protokollen wird das Primärmaterial vollständig zu Einzelzellen dissoziiert, häufig mit dem Ziel, die Zellen zu bekannten Zahlen aussäen zu können. Dies könnte jedoch einen limitierenden Faktor darstellen, der die Aufrechterhaltung der Zellviabilität stark einschränkt und erklärt, warum das Prostatakarzinom als klassische Monolayerkultur kaum zu züchten ist.

Erkenntnisse aus der Stammzellforschung sind ebenfalls von Young und Saar et al. in ihre Methodik der Kultivierung von Tumorproben der LuCaP Reihe integriert worden. LuCaP sind Xenografttumore, welche aus unterschiedlichen Stadien, lokaler wie auch metastasierter Prostatakarzinome bestehen. Dadurch repräsentieren sie die Heterogenität des Prostatakarzinoms.

Humane embryonale Stammzellen sind sehr vulnerabel gegenüber dem Verlust von Zell-Zell Kontakten. Eine Dissoziation zu Einzelzellen führt bei ihnen schnell zum Zelltod. Der Zelltod resultiert auch bei den embryonalen Stammzellen vermutlich aus der Unterbrechung E-Cadherin- vermittelter Signalwege.

Xu et al. konnten zwei sogenannte „small molecules“ identifizieren, die bei humanen embryonalen Stammzellen die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell Interaktion regulieren. Angriffspunkte dieser „small molecules“ sind Rho-abhängige Kinasen (ROCK). Durch Zugabe der „small molecules“ konnte nach

Vereinzelung embryonaler Stammzellen durch Trypsinverdau, welcher normalerweise zum Zelluntergang führen würde, die Zellviabilität trotzdem aufrechterhalten werden. Die E-Cadherin-vermittelte Apoptoseeinleitung nach Zell-Dissoziation wurde dadurch verhindert. (Xu et al., 2010; Young et al., 2013). Durch Hinzugabe des Rock Inhibitors Y-27632 gelang es Liu et al., eine in vitro Proliferation normaler wie auch maligner epithelialer Zellen zu induzieren (X. Liu et al., 2012).

Diese Erkenntnisse wurden in die Methodik unserer Arbeit integriert, da angenommen wurde, dass Voraussetzungen, welche eine in vitro Proliferation von Stammzellen ermöglichen, auch für eine Kultivierung von Prostatakarzinomzellen gelten könnten. So konnten wir unter Berücksichtigung der oben genannten Erkenntnisse beobachten, dass das von uns verwendete Zellmaterial nach Überführung der Zellcluster in das Zellkulturmedium sich rasch zu Sphäroiden formierte. Somit scheint auch für das Prostata-Primärmaterial die Beibehaltung der Zell-Zell Kontakte sowie die Zugabe des Rock-Inhibitors Y-27632 ein wegweisender Bestandteil für die Etablierung einer Sphäroidkultur zu sein.

Für 3-dimensionale Zellkulturen wurden in der Vergangenheit verschiedene Techniken entwickelt, die eine Herstellung von Sphäroiden ermöglichen sollen. Dazu gehört die Methode, eine Zellsuspension als hängende Tropfen an einer Oberfläche zu halten, woran sich die Zellen durch die Schwerkraft zu Sphäroiden anordnen. Bei einem anderen Verfahren wird in Zellkulturflaschen durch spezielle Drehung ein gravitationsfreier Raum erzeugt, in dem die Sphäroidbildung stattfinden soll. Eine weitere Möglichkeit, Sphäroide zu kultivieren, ist die Einbettung in eine Gelmatrix, in der Zellen sich zu einer 3-dimensionalen Struktur formieren, wie für LNCaP in Kapitel 2.2.4 dargestellt (Foty, 2011; Lang, Sharrard, Stark, Villette, & Maitland, 2001; Strube et al., 2017).

Die beschriebenen Verfahren sind sehr aufwändig in der Durchführung von Routinearbeiten wie beispielsweise Medienwechsel und Passagierungen. Darüber hinaus erfordern sie eine äußerst komplexe Ausrüstung.

Das technische Verfahren, welches in der vorliegenden Arbeit für die Sphäroidkultur angewendet wurde, ist im Handling einfacher als die oben beschriebenen Verfahren, da die benötigte Ausrüstung weniger komplex ist. Nachteile sind Zellfütterung und Passagierung, bei denen leicht Zellen verloren gehen können, was jedoch abhängig von der Erfahrung des Anwenders ist. Die Sphäroide schwimmen frei in ihrem Nährmedium. Dies wird dadurch ermöglicht, dass die Oberfläche der Zellkulturflaschen durch eine spezielle hydrophile, ladungsfreie Beschichtung (Ultra Low Attachment Surface) eine Zelladhäsion an den Wänden verhindert. Dadurch werden die Zellen zur gegenseitigen Fusionierung angeregt, Zell-Zell Interaktionen finden statt und eine Sphäroidbildung wird gefördert.

Das Zellkulturmedium enthält das aus der Kultivierung embryonaler Stammzellen verwendete StemProhESC Medium, welches den Insulin Like Growth Factor in supraphysiologischer Konzentration beinhaltet. Zudem wurde der Basic Fibroblast Growth Factor, das Androgen R1881 und der oben beschriebene Rock Inhibitor Y-27632 zugefügt. Die Rolle der einzelnen Komponenten für die Sphäroidbildung und deren Viabilität könnte in

zukünftigen Versuchen durch Testung mit unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren für die einzelnen Substanzen weiter untersucht werden.

Analyse des Zellmaterials

Die genauere morphologische Untersuchung der Sphäroide erfolgte durch häufige lichtmikroskopische Analyse des Zellmaterials und Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten, die zuvor aus den kultivierten Sphäroiden angefertigt wurden. Der LIVE/DEAD® Cell Viability Assay zeigte eine Zellviabilität des Zellmaterials über mehrere Monate hinweg. Die Ergebnisse der Hellfeldmikroskopie bestätigten die durch Lin&Chang et al. beschriebene Anordnung der Zellen, die in einer Suspension Sphäroide ausbilden (Abb. 1). Demnach waren in den Außenschichten mehrere Reihen epithelartig angeordneter Zellschichten zu sehen. Das Zentrum des Sphäroids enthielt nekrotisches Zellmaterial. Da nekrotisches Zellmaterial eine Gefahr für die Vitalität der Zellen darstellt, sollte künftig erörtert werden, wie der Nekroseanteil möglichst gering gehalten werden kann. Hierzu könnte eine häufigere mechanische Zerkleinerung der Sphäroide oder eine Verkürzung der Passagierungsintervalle dienen. Eine weitere Möglichkeit wäre ein umfangreicheres Aufspalten des Gewebes beim Primärverdau, beispielsweise durch andere Enzyme als die von uns verwendete Kollagenase.

Es sollte somit analysiert werden, ob bei geringerem Nekroseanteil eine Verlängerung der Viabilität und eine verbesserte Expansion der Sphäroidkultur ermöglicht werden kann.

Nachdem die Morphologie der Sphäroide sowie deren Viabilität über einen längeren Zeitraum gezeigt werden konnte, sollen im Folgenden die Ergebnisse der immunzytochemischen Phänotypisierung des Zellmaterials diskutiert und die Rolle der nachgewiesenen Zelltypen erörtert werden.

Wir konnten die in Tabelle 8 beschriebenen Zelltypen durch immunhistochemische und immunzytochemische Verfahren nachweisen. CK-5 und CK-8 positive Zellen waren in allen Versuchsreihen deutlich häufiger zu finden als Androgenrezeptor- und Ki67 positive Zellen.

In der Literatur werden folgende Zelltypen innerhalb der Prostata beschrieben (Abb. 20): Zu den drei epithelialen Zelltypen gehören androgenabhängige Luminalzellen, die durch die Expression des AR, PSA, CD24, CD26, CK-8 und CK-18 charakterisiert sind; die Basalzellen, die die Oberflächenmarker CD44, p63, CK-5 und CK-14 und in geringer Dichte auch den AR exprimieren, jedoch kein PSA (A. Y. Liu & True, 2002; Sherwood et al., 1990); die Intermediärzellen, welche eine Zwischenpopulation bilden, die sowohl die Zytokeratine der Basal- als auch der Luminalzellen exprimieren (Xue, Smedts, Debruyne, de la Rosette, & Schalken, 1998). Zwischen den genannten Zelltypen finden sich AR-negative neuroendokrine Zellen in geringer Anzahl (Noordzij, van Steenbrugge, van der Kwast, & Schroder, 1995). Fibroblasten stellen den Hauptanteil des Stromas dar.

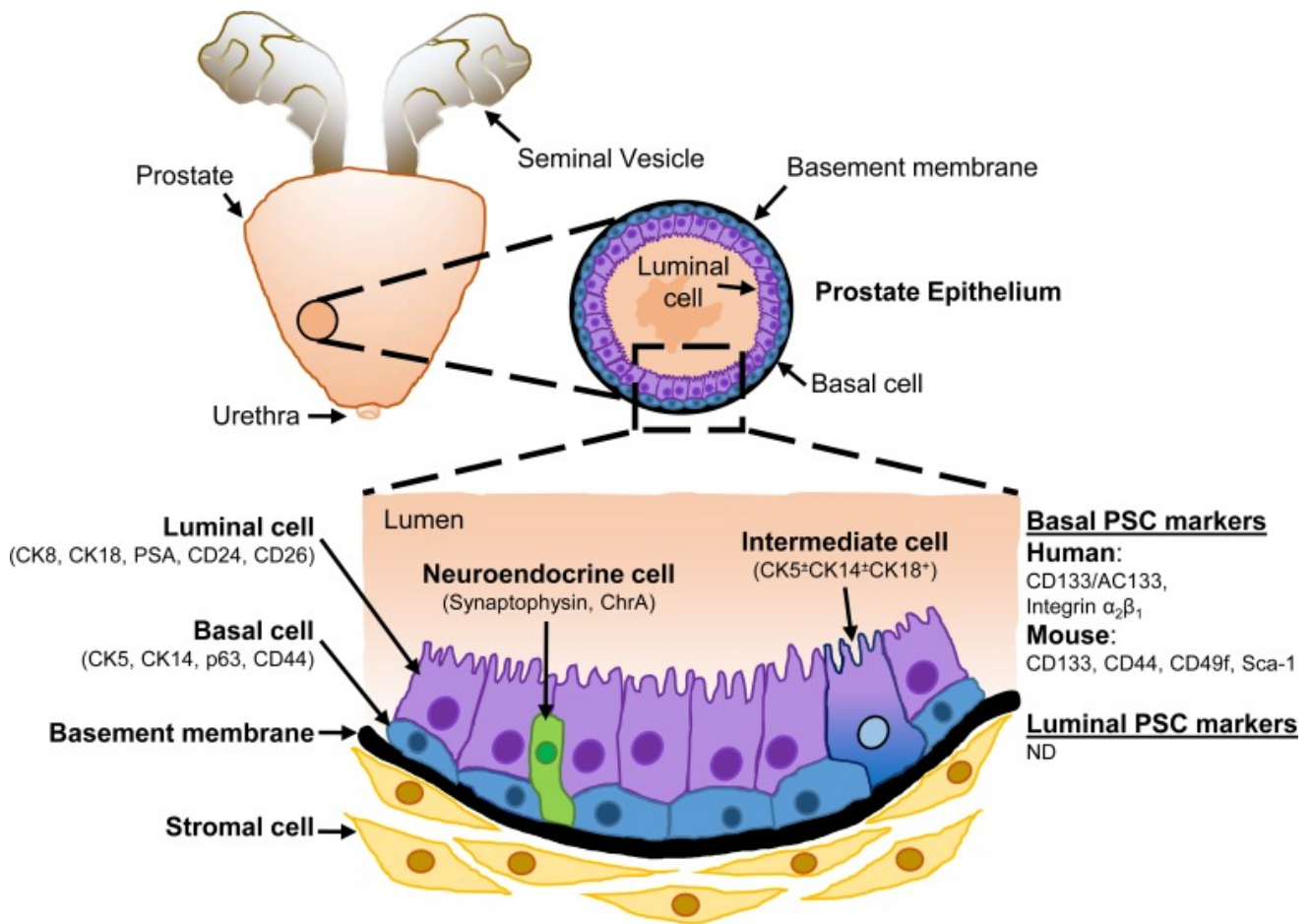


Abbildung 20: Übersicht über die zelluläre Architektur der Prostata-Epithelien. Quelle: (Rybak, Bristow, & Kapoor, 2015)

In der vorliegenden Arbeit konzentrierten wir uns auf die Überprüfung der Expressionsmarker CK-5, CK-8, AR und Ki67. Die Zytokeratine 5 und 8 konnten innerhalb der untersuchten Sphäroide sicher nachgewiesen werden. Der Anteil CK-8 positiver Zellen war um mindestens 10% höher als der CK-5 positiver Zellen. Wir konnten dadurch ein Vorhandensein sowohl von Luminal- als auch von Basalzellen bestätigen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass sich ein hoher Anteil prostataspezifischer bzw. prostatakarzinomspezifischer Zellen in unserer Sphäroidkultur befindet. Der höhere Anteil CK-8-positiver Zellen deutet auf ein Überwiegen von Luminalzellen hin. Der Nachweis dieser Zellen sollte in weiteren Versuchen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten überprüft werden, um eine Dynamik im Verhältnis der Anteile luminaler und basaler Zellen zu erfassen. Ein Nachweis von intermediären Zellen erfordert eine Doppelfärbung beider Zytokeratine. Dies könnte in zukünftigen Charakterisierungsassays untersucht werden.

Wie in Tabelle 8 gezeigt, konnte nur eine geringe Expression des Androgenrezeptors in maximal 5% des Zellmaterials nachgewiesen werden. Da der Androgenrezeptor bekanntermaßen eine entscheidende Rolle beim Prostatakarzinomen spielt, ist es unbedingt erforderlich, dass der Androgenrezeptor bei einem

Zellkulturmodell vorhanden ist. Bei einigen für das Prostatakarzinom etablierten Zellkultursystemen wie beispielsweise der Zelllinie DU-145 oder PC-3 ist kein Androgenrezeptor nachweisbar. Häufig wird das Fehlen eines Androgenrezeptors stellvertretend als Modell eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms gewertet. Dies ist irreführend, da insbesondere der Androgenrezeptor sowie die dadurch regulierten androgenrezeptor-abhängigen Gene bei der Tumorprogression vom hormonabhängigen zum kastrationsresistenten Prostatakarzinom eine entscheidende Rolle spielen (Scher et al 2005). Der Begriff kastrationsresistent bedeutet lediglich, dass der Androgenentzug bis auf Kastrationsniveau die Tumorprogression nicht zu stoppen vermag, der Androgenrezeptor aber nach wie vor in dieser Situation eine wichtige Bedeutung hat. Daher ist der Nachweis eines Androgenrezeptors bei einem aussagekräftigen Tumormodell unabdingbar.

Die geringe Expression in den durchgeführten Assays könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass die von uns verwendeten Darstellungsverfahren (immunzytochemische Färbung) keine ausreichende Sensitivität aufwiesen. Andererseits ist es auch möglich, dass unter den Kultivierungsbedingungen eine Selektion auf bestimmte Zelltypen stattfindet, unter denen androgenrezeptor-positive Zellen dezimiert werden.

Die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 war in den untersuchten Fällen mit 0-3% gering. Ki67 ermöglicht einen Nachweis in Teilung befindlicher Zellen, wodurch Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten gezogen werden können. Die geringe Expression in unseren Ergebnissen erklärt sich zum einen durch das ohnehin langsame Zellwachstum der Prostata bzw. des Prostatakarzinoms im lokal begrenzten Stadium (Li et al., 2004; Linxweiler et al., 2019).

Möglich ist jedoch auch hier, dass die Kultivierungsbedingungen Ki67 positive Zellen dezimieren. Es muss künftig geklärt werden, ob die Proliferation der Zellen durch Anpassung der Kultivierungsbedingungen beschleunigt werden kann. Eine expansionsfähige in vitro Kultur ist für Forschungszwecke von größerem Wert, da sie einen permanenten Nachschub an Zellen liefert.

Mittels des Proliferationsassays CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) konnten wir über einen Beobachtungszeitraum von 7 Tagen über die ersten 4 Tage hinweg eine Expansion des Zellmaterials nachweisen mit anschließend konstantem Vitalitätsnachweis.

Das limitierte Zellmaterial erschwerte sowohl die immunzytochemischen Färbungen als auch die Untersuchung der Zellproliferation, da jeweils große Anteile des Zellmaterials für die jeweiligen Assays verwendet wurden. Für den CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) war es notwendig, fast alle Sphäroide eines Patientenfalles zu verwenden. Dadurch war eine weitergehende Kultivierung des entsprechenden Patientenfalles kaum möglich. Anders als das Zellmaterial der Xenograftumore der LuCaP Reihe, welche der Arbeitsgruppe um Peehl et al. in ausreichender Menge zur Verfügung standen, konnten wir nur sehr limitierte Mengen von primärem Patientenmaterial für Forschungszwecke gewinnen. Dies liegt zum einen daran, dass die Tumorumfänge bei Diagnosestellung immer geringer werden (Stamey et al., 2004). Zum anderen musste sichergestellt werden, dass die

histopathologische Befundung der Resektate nicht beeinträchtigt wird, weswegen nur kleine Gewebemengen extrahiert werden durften.

Der Nachweis einer Expansion des Zellmaterials mittels des o.g. MTS Assays gelang nur bei einer Aussaat von 10000 Zellen pro Well. Es wurden zum Vergleich Versuchsreihen mit einer Aussaat von 15000 Zellen pro Well durchgeführt. Hierbei konnte jedoch keine Expansion nachgewiesen werden, im Gegenteil, es zeigten sich über den Beobachtungszeitraum hinweg rückläufige Zellvitalitäten.

Dies belegt, dass die Dichte der Aussaat ebenfalls einen Einfluss auf das Zellüberleben und die Expansionsfähigkeit hat. Möglicherweise war das Verhältnis von Nährstoffangebot zur Zellzahl bei der Aussaat zu 15000 Zellen zu gering. Die Tatsache, dass die Aussaat geringerer Zellzahlen bessere Ergebnisse bezüglich der Proliferationsfähigkeit liefert, kommt uns zugute, da so nur ein kleinerer Teil des Zellmaterials für den Proliferationsassay aufgewendet werden muss. Künftig sollte untersucht werden, ob die Proliferation bei der Aussaat noch geringerer Zellzahlen weiter gesteigert werden kann.

Der Proliferationsassay (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)) erfordert eine weitgehende Dissoziation der Sphäroide zu Einzelzellen bzw. zu kleinen Zellagregaten. Da dabei viele Zell-Zell Kontakte aufgehoben werden, behindert dieses Vorgehen unsere Theorie der Notwendigkeit einer Aufrechterhaltung von Zell-Zell Kontakten für den Fortbestand der Zellviabilität. Dadurch wird die geringe Proliferationsfähigkeit weiter eingeschränkt und eine Untersuchung der tatsächlichen Proliferationsrate dieses Zellkultursystems wird verfälscht. Es sollte daher künftig nach Proliferationsassays gesucht werden, bei denen auch unter Beibehaltung der Sphäroidstruktur das Proliferationsverhalten erfasst werden kann. Hierfür kann der Cytotoxicity Detection KitPlus(LDH) angeführt werden. Grundlage der Quantifizierung ist die komplette Freisetzung der zytoplasmatischen LDH aller Zellen nach vorheriger Lyse, wodurch auf die Zellmenge rückgeschlossen werden kann. Vorteil des Cytotoxicity Detection KitPlus(LDH) ist die Möglichkeit, die Zellmenge auch ohne Dissoziation der Sphäroide zu quantifizieren, d.h. auch größere Sphäroide können untersucht werden. Nachteil des Cytotoxicity Detection KitPlus(LDH) ist die gleichzeitige Erfassung von Nekrose, da durch nekrotisches Zellmaterial ebenfalls LDH freigesetzt wird. Dadurch werden die Ergebnisse der LDH-Freisetzung aus den vitalen Zellen nach deren Lyse verfälscht. Da unsere Paraffinschnitte der Primärkultur-Sphäroide auch einen Nekroseanteil im Kern der Sphäroide zeigten, entschieden wir uns für den Nachweis der Zellproliferation den CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) zu verwenden, der bereits bei den LuCaP-Kulturen von Young et al. erfolgreich publiziert wurde.

Ein Vorteil des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), welcher auf dem Nachweis metabolisch aktiver Mitochondrien basiert, ist die Möglichkeit einer Medikamententestung. Beispielsweise kann der Effekt antiproliferativ wirkender Medikamente mittels dieses Proliferationsassays nachgewiesen werden. Da eine Medikamententestung an unserer Sphäroidkultur durchgeführt werden soll, ist die Etablierung dieses Proliferationsassays für unsere Sphäroidkultur sehr wertvoll.

Künftig sollte gleichzeitig versucht werden, den Nekroseanteil der Sphäroide zu minimieren, sodass auch der

Cytotoxicity Detection KitPlus(LDH) zum Nachweis der Zellproliferation verwendet werden kann.

Ausblick für künftige Untersuchungen

Für eine genauere phänotypische Charakterisierung und eine Erfassung von Apoptose und Proliferation bei Zellkulturen mit geringem Zellmaterial sollten weitere Analyseverfahren in Betracht gezogen werden. Die konventionelle PCR und das Western Blotting erfordern relativ hohe Zellzahlen, sodass diese klassischen Verfahren bei Sphäroidkulturen mit geringen Zellzahlen nur eingeschränkt angewendet werden können.

In der Literatur sind bereits Verfahren beschrieben, bei denen sehr geringe Zellzahlen ausreichen, um weitreichende Untersuchungen am Zellmaterial durchführen zu können. Hierzu gehört das Microfluid-Immunblotting zur Analyse von Protein/DNA (He & Herr, 2010) sowie die Mikrodurchflusszytometrie (Wlodkowic & Darzynkiewicz, 2011; J. Wong, Simmons, & Young, 2017). Darüber hinaus stehen Kits zur Verfügung, die eine direkte cDNA Synthese erlauben, ohne dass eine vorherige RNA Isolierung erforderlich ist. Dadurch kann auch geringes Zellmaterial mittels RT-PCR analysiert werden.

Diese neueren Methoden sind vielversprechend und zeigen, dass in näherer Zukunft immer mehr Verfahren verfügbar sein könnten, die die Analyse von Zellmaterial auch bei Zellkultursystemen mit geringen Zellzahlen möglich machen. Unter der Verwendung exakterer Analyseverfahren sollten weitergehende Charakterisierungen exaktere Aussagen über die vorhandenen Zelltypen, welche sich innerhalb der Sphäroide befinden, liefern. In der heute üblichen histopathologischen Diagnostik des Prostatakarzinoms wird der Verlust von Basalzellen sowie die Expression der Marker AMACR, AR und PSA überprüft. Diese Marker können problemlos auch an Paraffinschnitten der Sphäroide der Primärkultur untersucht werden.

Der definitive Nachweis von Karzinommaterial wurde in der vorliegenden Arbeit noch nicht erbracht, es ist jedoch zu diskutieren, durch welche Eigenschaften bzw. Charakterisierungsverfahren das Prostatakarzinom überhaupt sicher nachgewiesen werden kann. Die Tatsache, dass derzeit noch immer Unklarheit über diejenigen Zellen besteht, aus denen ein Prostatakarzinom initial hervorgeht, wird ebenfalls auf die fehlenden bzw. nicht ausreichend repräsentativen präklinischen Modelle zurückgeführt (Goldstein, Huang, Guo, Garraway, & Witte, 2010). In der Literatur sind unterschiedliche Theorien über die Ursprungszelle des Prostatakarzinoms zu finden. So wurde beschrieben, dass das Karzinom aus differenzierten Luminalzellen hervorgeht, da die Luminalzellmarker (CK-8, CK-18, AR, PSA, PAP) von den meisten Prostatakarzinomen exprimiert werden, nicht aber Basalzellmarker wie p63 (Signoretti et al., 2000). Andere Autoren sehen intermediäre Vorläuferzellen, die die Fähigkeit zur unkontrollierten Proliferation erlangt haben, als Initiatoren des Prostatakarzinoms an (van Leenders et al., 2002). Demgegenüber wurde von Xin et al. berichtet, dass Prostatakarzinomzellen einen konstitutiv aktiven AKT Signalweg aufweisen und den Oberflächenmarker Sca-1 exprimierten. Diese Zellen jedoch haben sowohl Eigenschaften von Luminal- als auch von Basalzellen (Xin, Lawson, & Witte, 2005).

Aus der Forschung anderer Tumorentitäten, wie dem Mammakarzinom, dem Bronchialkarzinom oder der akuten myeloischen Leukämie, ergibt sich Evidenz dafür, dass die Tumoren einer hierarchischen Organisation unterliegen, die auf sogenannten Tumorstammzellen basiert, aus denen die malignen Zellen hervorgehen (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003; Bonnet & Dick, 1997; Singh et al., 2003). Diese Tumorstammzellen haben, analog zu normalen Stammzellen, die Fähigkeit zur uneingeschränkten Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung. Bei einigen Tumorerkrankungen konnten die Tumorstammzellen bereits eindeutig identifiziert werden und es wurde beobachtet, dass sie viele Ähnlichkeiten zu Stammzellen gesunder Gewebe aufweisen (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001).

Auch für das Prostatakarzinom gibt es Evidenz, dass es ebenfalls aus Tumorstammzellen hervorgeht. Diese machen jedoch nur einen sehr geringen Anteil von ca. 0,1% der Zellen aus. Einige Eigenschaften des Prostatakarzinoms, wie die ausgeprägte Heterogenität des Tumors, die geringe Sensitivität gegenüber Chemotherapie sowie die Entwicklung vom zunächst hormonabhängigen zum kastrationsresistenten Karzinom, können sich durch die Tumorstammzell-Theorie erklären lassen, da sich die heterogenen Tumorzellen aus mehreren Foci unterschiedlicher Tumorstammzellen innerhalb der Prostata differenzieren (Rybak et al., 2015). Unter der Annahme, dass die Stammzelltheorie ein gültiges Konzept für die Prostatakarzinomentstehung darstellt, könnte ein 3-dimensionales Tumormodell geeignet sein, das Vorhandensein von Tumorstammzellen nachzuweisen und deren Entwicklung gezielt und systematisch nachzuverfolgen.

Einige weitere bereits beschriebene Merkmale, die eine Spezifität für Prostatakarzinomzellen aufweisen sollen, können in künftigen Versuchsreihen anhand unseres in vitro Modells getestet werden. Hierzu gehört die Expression des TMPRSS2-ERG Fusionsgens, welches auch immunhistochemisch dargestellt werden kann (Tomlins et al., 2005). Eine immunhistochemische Darstellung des mesenchymalen Markers Vimentin sowie α SMA kann das Vorhandensein von tumorassoziierten Stromazellen nachweisen, welche eine wichtige Rolle bei der Progression des Prostatakarzinoms spielen (Sasaki, Franco, & Hayward, 2017).

Somit kann zusammengefasst werden, dass unser neu etabliertes Sphäroidmodell die Expansion des primären Tumorzellmaterials des Prostatakarzinoms in vitro erlaubt.

Zu den derzeit stattfindenden Weiterentwicklungen gehört eine vergleichende Analyse von Sphäroiden verschiedener Tumorstadien, die initial durch intraoperative Schnellschnittdiagnostik differenziert werden. Die Kultivierung erfolgt auf die hier vorgestellte Weise. Darüber hinaus wird ein Anwachsen der Sphäroide als Xenografttumoren in Mäusen erprobt, wodurch ein komplementäres in vivo Mausmodell generiert werden soll.

Es könnte also künftig gezeigt werden, dass unser in vitro Modell auch eine in vivo Expansion von primärem Tumorgewebe des Prostatakarzinoms erlaubt. Diese Situation ermöglicht die systematische Beforschung dynamischer Prozesse der Tumorprogression in vitro wie auch in vivo. Somit wäre eine fundierte Grundlage für die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze geschaffen.

6 Literaturverzeichnis

1. Afshar-Oromieh, A., Haberkorn, U., Schlemmer, H., Fenchel, M., Eder, M., Eisenhut, M., . . . Röthke, M. (2014). Comparison of PET/CT and PET/MRI hybrid systems using a ⁶⁸Ga-labelled PSMA ligand for the diagnosis of recurrent prostate cancer: initial experience. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 41:887-897
2. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:3983-3988
3. Albertsen, P. C., Hanley, J. A., & Fine, J. (2005). 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *Jama*, 293:2095-2101
4. Barbieri, C. E., Bangma, C. H., Bjartell, A., Catto, J. W., Culig, Z., Grönberg, H., . . . Rubin, M. A. (2013). The mutational landscape of prostate cancer. *European urology*, 64:567-576
5. Bates, R. C., Lincz, L. F., & Burns, G. F. (1995). Involvement of integrins in cell survival. *Cancer and Metastasis Reviews*, 14:191-203
6. Batzler, W. U., Giersiepen, K., Hentschel, S., Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., . . . Stabenow, R. (2008). Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends.
7. Beer, T. M., Armstrong, A. J., Rathkopf, D. E., Loriot, Y., Sternberg, C. N., Higano, C. S., . . . Chowdhury, S. (2014). Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 371:424-433
8. Berger, M. F., Lawrence, M. S., Demichelis, F., Drier, Y., Cibulskis, K., Sivachenko, A. Y., . . . Sougnez, C. (2011). The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*, 470:214-220
9. Berthold, D. R., Pond, G. R., Soban, F., de Wit, R., Eisenberger, M., & Tannock, I. F. (2008). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *Journal of Clinical Oncology*, 26:242-245
10. Beske, F. (2007). *Gesundheitsversorgung 2050: Prognose für Deutschland und Schleswig-Holstein*: Schmidt & Klaunig.
11. Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3:730-737
12. Brock, M., von Bodman, C., Palisaar, R. J., Lötters, B., Sommerer, F., Deix, T., . . . Eggert, T. (2012). The impact of real-time elastography guiding a systematic prostate biopsy to improve cancer detection rate: a prospective study of 353 patients. *The Journal of urology*, 187:2039-2043
13. Cabot, R. C., Harris, N. L., Rosenberg, E. S., Shepard, J.-A. O., Cort, A. M., Ebeling, S. H., . . . Saad, F. (2012). Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 367:1187-1197
14. Carter, H. B., Pearson, J. D., Metter, E. J., Brant, L. J., Chan, D. W., Andres, R., . . . Walsh, P. C. (1992). Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *Jama*, 267:2215-2220
15. Cash, H., Maxeiner, A., Stephan, C., Fischer, T., Durmus, T., Holzmann, J., . . . Neymeyer, J. (2016). The detection of significant prostate cancer is correlated with the Prostate Imaging Reporting and Data System (PI-RADS) in MRI/transrectal ultrasound fusion biopsy. *World journal of urology*, 34:525-532
16. Catalona, W. J., Beiser, J. A., & Smith, D. S. (1997). Serum free prostate specific antigen and prostate specific antigen density measurements for predicting cancer in men with prior negative prostatic biopsies. *The Journal of urology*, 158:2162-2167
17. Cheteh, E. H., Augsten, M., Rundqvist, H., Bianchi, J., Sarne, V., Egevad, L., . . . Wiman, K. G. (2017). Human cancer-associated fibroblasts enhance glutathione levels and antagonize drug-induced prostate cancer cell death. *Cell death & disease*, 8:2848
18. Chun, F. K.-H., Briganti, A., Graefen, M., Montorsi, F., Porter, C., Scattoni, V., . . . Steuber, T. (2007). Development and external validation of an extended 10-core biopsy nomogram. *European urology*, 52:436-445
19. Clark, A. K., Taubenberger, A. V., Taylor, R. A., Niranjana, B., Chea, Z. Y., Zotenko, E., . . . Frydenberg,

- M. (2013). A bioengineered microenvironment to quantitatively measure the tumorigenic properties of cancer-associated fibroblasts in human prostate cancer. *Biomaterials*, 34:4777-4785
20. Croix, B. S., & Kerbel, R. S. (1997). Cell adhesion and drug resistance in cancer. *Current opinion in oncology*, 9:549-556
21. Cunningham, D., & You, Z. (2015). In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *Journal of biological methods*, 2(1)
22. de Bono, J. S., Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., Machiels, J.-P., Kocak, I., . . . Shen, L. (2010). Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *The Lancet*, 376:1147-1154
23. Desoize, B., & Jardillier, J.-C. (2000). Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Critical reviews in oncology/hematology*, 36:193-207
24. Deutsche Krebsgesellschaft, A. (2018). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 5.0, AWMF Registernummer: 043/022OL. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF)*
25. Draisma, G., Etzioni, R., Tsodikov, A., Mariotto, A., Wever, E., Gulati, R., . . . de Koning, H. (2009). Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *Journal of the National Cancer Institute*.
26. Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., . . . Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine*, 2:561-566
27. Ellem, S. J., De-Juan-Pardo, E. M., & Risbridger, G. P. (2014). In vitro modeling of the prostate cancer microenvironment. *Advanced drug delivery reviews*, 79:214-221
28. Epstein, J. I., Allsbrook Jr, W. C., Amin, M. B., Egevad, L. L., & Committee, I. G. (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 29:1228-1242
29. Esquenet, M., Swinnen, J. V., Heyns, W., & Verhoeven, G. (1997). LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 62:391-399
30. Fizazi, K., Carducci, M., Smith, M., Damião, R., Brown, J., Karsh, L., . . . Wang, H. (2011). Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *The Lancet*, 377:813-822
31. Fizazi, K., Tran, N., Fein, L., Matsubara, N., Rodriguez-Antolin, A., Alekseev, B. Y., . . . Protheroe, A. (2017). Abiraterone plus prednisone in metastatic, castration-sensitive prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 377:352-360
32. Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *Journal of visualized experiments: JoVE*(51).
33. Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology*, 124:619-626
34. Gao, D., Vela, I., Sboner, A., Iaquinta, P. J., Karthaus, W. R., Gopalan, A., . . . Chen, Y. (2014). Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*, 159:176-187
35. Georges, P., Muirhead, R. P., Williams, L., Holman, S., Tabiin, M. T., Dean, S. K., & Tuch, B. E. (2002). Comparison of size, viability, and function of fetal pig islet-like cell clusters after digestion using collagenase or liberase. *Cell transplantation*, 11:539-545
36. Gleason, D. F., Mellinger, G. T., & Group, V. A. C. U. R. (2002). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of urology*, 167:953-958
37. Goldstein, A. S., Huang, J., Guo, C., Garraway, I. P., & Witte, O. N. (2010). Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science*, 329:568-571
38. Grasso, C. S., Wu, Y.-M., Robinson, D. R., Cao, X., Dhanasekaran, S. M., Khan, A. P., . . . Brenner, J. C. (2012). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*, 487:239-243
39. Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6:622-634
40. Haas, G. P., Delongchamps, N., Brawley, O. W., Wang, C. Y., & de la Roza, G. (2008). The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol*, 15: 3866

41. Harisinghani, M. G., Barentsz, J., Hahn, P. F., Deserno, W. M., Tabatabaei, S., van de Kaa, C. H., . . . Weissleder, R. (2003). Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 348:2491-2499
42. He, M., & Herr, A. E. (2010). Automated microfluidic protein immunoblotting. *Nature protocols*, 5:1844-1856
43. Heijnsdijk, E., der Kinderen, A., Wever, E., Draisma, G., Roobol, M., & De Koning, H. (2009). Overdetection, overtreatment and costs in prostate-specific antigen screening for prostate cancer. *British journal of cancer*, 101:1833-1838
44. Hoarau-Véhot, J., Rafii, A., Touboul, C., & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International journal of molecular sciences*, 19:181
45. Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., . . . Murphy, G. P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*, 43:1809-1818
46. Hugosson, J., Roobol, M. J., Månsson, M., Tammela, T. L., Zappa, M., Nelen, V., . . . Talala, K. M. (2019). A 16-yr Follow-up of the European Randomized study of Screening for Prostate Cancer. *European urology*.
47. Kaighn, M. E., Lechner, J. F., Narayan, K. S., & Jones, L. W. (1978). Prostate carcinoma: tissue culture cell lines. *Natl Cancer Inst Monogr* 49:17-21
48. Karthaus, W. R., Iaquinata, P. J., Drost, J., Gracanin, A., Van Boxtel, R., Wongvipat, J., . . . Sachs, N. (2014). Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell*, 159:163-175
49. Kim, J. B. (2005). Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol*, 15:365-377
50. Kinsella, N., Helleman, J., Bruinsma, S., Carlsson, S., Cahill, D., Brown, C., & Van Hemelrijck, M. (2018). Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of contemporary worldwide practices. *Translational andrology and urology*, 7:83
51. Kondo, J., Endo, H., Okuyama, H., Ishikawa, O., Iishi, H., Tsujii, M., . . . Inoue, M. (2011). Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:6235-624
52. Korenchuk, S., Lehr, J. E., L, M. C., Lee, Y. G., Whitney, S., Vessella, R., . . . Pienta, K. J. (2001). VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. *In Vivo*, 15:163-168
53. Korzeniewski, N., Tapia-Laliena, M., Tolstov, Y., Pahernik, S., Hadaschik, B., Hohenfellner, M., & Duensing, S. (2013). Neue präklinische Modelle und Biomarker beim Prostatakarzinom. *Der Urologe*, 52:1256-1260
54. Kunz-Schughart, L. A., Freyer, J. P., Hofstaedter, F., & Ebner, R. (2004). The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *Journal of biomolecular screening*, 9:273-285
55. Kurioka, D., Takagi, A., Yoneda, M., Hirokawa, Y., Shiraishi, T., & Watanabe, M. (2012). Multicellular spheroid culture models: applications in prostate cancer research and therapeutics. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 2011.
56. Labanaris, A. P., Engelhard, K., Zugor, V., Nützel, R., & Kühn, R. (2010). Prostate cancer detection using an extended prostate biopsy schema in combination with additional targeted cores from suspicious images in conventional and functional endorectal magnetic resonance imaging of the prostate. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 13:65-70
57. Lang, S., Sharrard, R., Stark, M., Villette, J., & Maitland, N. (2001). Prostate epithelial cell lines form spheroids with evidence of glandular differentiation in three-dimensional Matrigel cultures. *British journal of cancer*, 85:590
58. Laurent, J., Frongia, C., Cazales, M., Mondesert, O., Ducommun, B., & Lobjois, V. (2013). Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. *BMC cancer*, 13:73
59. Lawrentschuk, N., & Fleshner, N. (2009). The role of magnetic resonance imaging in targeting prostate cancer in patients with previous negative biopsies and elevated prostate-specific antigen levels. *BJU Int*, 103:730-733
60. Li, R., Heydon, K., Hammond, M. E., Grignon, D. J., Roach, M., Wolkov, H. B., . . . Pollack, A. (2004). Ki-67 staining index predicts distant metastasis and survival in locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy: an analysis of patients in radiation therapy oncology group protocol 86-10. *Clinical*

- Cancer Research*, 10:4118-4124
61. Lin, R. Z., & Chang, H. Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology journal*, 3:1172-1184
 62. Lindberg, A., Talala, K., Kujala, P., Stenman, U. H., Taari, K., Kilpeläinen, T. P., . . . Auvinen, A. (2019). Bias-corrected estimates of effects of PSA screening decisions on the risk of prostate cancer diagnosis and death: Analysis of the Finnish randomized study of screening for prostate cancer. *International Journal of Cancer*.
 63. Linxweiler, J., Hammer, M., Muhs, S., Kohn, M., Pryalukhin, A., Veith, C., . . . Saar, M. (2019). Patient-derived, three-dimensional spheroid cultures provide a versatile translational model for the study of organ-confined prostate cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 145:551-559
 64. Liu, A. Y., & True, L. D. (2002). Characterization of prostate cell types by CD cell surface molecules. *Am J Pathol*, 160:37-43
 65. Liu, X., Ory, V., Chapman, S., Yuan, H., Albanese, C., Kallakury, B., . . . Simic, V. (2012). ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *The American journal of pathology*, 180:599-607
 66. Logothetis, C. J., Gallick, G. E., Maity, S. N., Kim, J., Aparicio, A., Efstathiou, E., & Lin, S.-H. (2013). Molecular classification of prostate cancer progression: foundation for marker-driven treatment of prostate cancer. *Cancer discovery*, 3:849-861
 67. Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129: 1261-1274
 68. Mertz, K. D., Setlur, S. R., Dhanasekaran, S. M., Demichelis, F., Perner, S., Tomlins, S., . . . Rubin, M. A. (2007). Molecular characterization of TMPRSS2-ERG gene fusion in the NCI-H660 prostate cancer cell line: a new perspective for an old model. *Neoplasia*, 9:200-206
 69. Miller, K. (2011). [Castration resistant prostate cancer 2011]. *Aktuelle Urologie*, 42:95-102
 70. Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., Cumberbatch, M. G., De Santis, M., . . . Joniau, S. (2017). EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. *European urology*, 71:618-629
 71. Navone, N. M., Olive, M., Ozen, M., Davis, R., Troncoso, P., Tu, S. M., . . . Logothetis, C. J. (1997). Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis. *Clin Cancer Res*, 3:2493-2500
 72. Noordzij, M. A., van Steenbrugge, G. J., van der Kwast, T. H., & Schroder, F. H. (1995). Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Urol Res*, 22:333-341
 73. Nunes, A. S., Barros, A. S., Costa, E. C., Moreira, A. F., & Correia, I. J. (2019). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnology and bioengineering*, 116:206-226
 74. O'Connor, K. C. (1999). Three-dimensional cultures of prostatic cells: tissue models for the development of novel anti-cancer therapies. *Pharmaceutical research*, 16:486-493
 75. Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., Chute, C. G., Guess, H. A., Girman, C. J., Panser, L. A., & Lieber, M. M. (1993). Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. *Jama*, 270:860-864
 76. Peehl, D. (2005). Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocrine-Related Cancer*, 12:19-47
 77. Pienta, K. J., Abate-Shen, C., Agus, D. B., Attar, R. M., Chung, L. W., Greenberg, N. M., . . . Peehl, D. M. (2008). The current state of preclinical prostate cancer animal models. *The Prostate*, 68: 629-639
 78. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414:105-111
 79. Rodriguez-Enriquez, S., Gallardo-Perez, J. C., Aviles-Salas, A., Marin-Hernandez, A., Carreno-Fuentes, L., Maldonado-Lagunas, V., & Moreno-Sanchez, R. (2008). Energy metabolism transition in multicellular human tumor spheroids. *J Cell Physiol*, 216:189-197
 80. Ryan, C. J., Smith, M. R., De Bono, J. S., Molina, A., Logothetis, C. J., De Souza, P., . . . Ng, S. (2013). Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 368:138-148
 81. Rybak, A. P., Bristow, R. G., & Kapoor, A. (2015). Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*, 6:1900-1919
 82. Saad, F., Gleason, D. M., Murray, R., Tchekmedyian, S., Venner, P., Lacombe, L., . . . Zheng, M. (2004).

- Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96:879-882
83. Saar, M., Zhao, H., Nolley, R., Young, S. R., Coleman, I., Nelson, P. S., . . . Peehl, D. M. (2014). Spheroid culture of LuCaP 147 as an authentic preclinical model of prostate cancer subtype with SPOP mutation and hypermutator phenotype. *Cancer letters*, 351:272-280
 84. Sasaki, T., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2017). Interaction of prostate carcinoma-associated fibroblasts with human epithelial cell lines in vivo. *Differentiation*, 96:40-48.
 85. Scher, H. I., & Sawyers, C. L. (2005). Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *Journal of Clinical Oncology*, 23:8253-8261
 86. Schmid, M., Trinh, Q.-D., Graefen, M., Fisch, M., Chun, F. K., & Hansen, J. (2014). The role of biomarkers in the assessment of prostate cancer risk prior to prostate biopsy: Which markers matter and how should they be used? *World journal of urology*, 32:871-880
 87. Schröder, F. H., Hugosson, J., Roobol, M. J., Tammela, T. L., Ciatto, S., Nelen, V., . . . Zappa, M. (2012). Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *New England Journal of Medicine*, 366:981-990
 88. Scovell, J. M., Butler, P., Ramasamy, R., & Lamb, D. J. (2015). Re: Testosterone Treatment Is a Potent Tumor Promoter for the Rat Prostate. *European urology*, 67:814-815
 89. Sherwood, E. R., Berg, L. A., Mitchell, N. J., McNeal, J. E., Kozlowski, J. M., & Lee, C. (1990). Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *J Urol*, 143:167-171
 90. Signoretti, S., Waltregny, D., Dilks, J., Isaac, B., Lin, D., Garraway, L., . . . Loda, M. (2000). p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol*, 157:1769-1775
 91. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63:5821-5828
 92. Smith, R. A., Andrews, K. S., Brooks, D., Fedewa, S. A., Manassaram-Baptiste, D., Saslow, D., . . . Wender, R. C. (2018). Cancer screening in the United States, 2018: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68:297-316
 93. Sobel, R., & Sadar, M. (2005). Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines—part 1. *The Journal of urology*, 173:342-359
 94. Solit, D. B., Garraway, L. A., Pratilas, C. A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., . . . Osman, I. (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*, 439:358-362
 95. Stamey, T. A., Caldwell, M., McNEAL, J. E., Nolley, R., Hemenez, M., & Downs, J. (2004). The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *The Journal of urology*, 172:1297-1301
 96. Strube, R., Haugstetter, J., Furter, M., Fernandez, A., Fluri, D., & Kelm, J. M. (2017). Gravity-enforced microtissue engineering. *Technology Platforms for 3D Cell Culture: A User's Guide*, 23.
 97. Sweeney, C. J., Chen, Y.-H., Carducci, M., Liu, G., Jarrard, D. F., Eisenberger, M., . . . Cooney, M. M. (2015). Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 373:737-746
 98. Sydes, M. R., Spears, M. R., Mason, M. D., Clarke, N. W., Dearnaley, D. P., de Bono, J. S., . . . Gillissen, S. (2018). Adding abiraterone or docetaxel to long-term hormone therapy for prostate cancer: directly randomised data from the STAMPEDE multi-arm, multi-stage platform protocol. *Annals of Oncology*, 29:1235-1248.
 99. Tao, Z., Shi, A., Wang, K., & Zhang, W. (2015). Epidemiology of prostate cancer: current status. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19:805-812
 100. Taylor, B. S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B. S., . . . Reva, B. (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer cell*, 18:11-22
 101. Taylor, R., & Risbridger, G. (2008). Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression. *Current cancer drug targets*, 8:490-497
 102. Thompson, I. M., Ankerst, D. P., Etzioni, R., & Wang, T. (2008). It's time to abandon an upper limit of normal for prostate specific antigen: assessing the risk of prostate cancer. *The Journal of urology*, 180:1219-1222
 103. Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X.-W., . . . Kuefer, R. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*,

310:644-648

104. van Leenders, G., van Balken, B., Aalders, T., Hulsbergen-van de Kaa, C., Ruiter, D., & Schalken, J. (2002). Intermediate cells in normal and malignant prostate epithelium express c-MET: implications for prostate cancer invasion. *Prostate*, 51:98-107
105. Wang, H., Huang, S., Shou, J., Su, E. W., Onyia, J. E., Liao, B., & Li, S. (2006). Comparative analysis and integrative classification of NCI60 cell lines and primary tumors using gene expression profiling data. *BMC genomics*, 7:1
106. Wawroschek, F., Wagner, T., Hamm, M., Weckermann, D., Vogt, H., Märkl, B., . . . Harzmann, R. (2003). The influence of serial sections, immunohistochemistry, and extension of pelvic lymph node dissection on the lymph node status in clinically localized prostate cancer. *European urology*, 43: 132-137
107. Whittle, J. R., Lewis, M. T., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2015). Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast cancer research*, 17(1), 17.
108. Wlodkowic, D., & Darzynkiewicz, Z. (2011). Rise of the micromachines: microfluidics and the future of cytometry. *Methods in cell biology*, 102:105
109. Wong, J., Simmons, C., & Young, E. (2017). Modeling and Measurement of Biomolecular Transport and Sensing in Microfluidic Cell Culture and Analysis Systems *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes* (pp. 41-75)
110. Wong, M. C., Hamilton, W., Whiteman, D. C., Jiang, J. Y., Qiao, Y., Fung, F. D., . . . Wu, J. C. (2018). Global Incidence and mortality of oesophageal cancer and their correlation with socioeconomic indicators temporal patterns and trends in 41 countries. *Scientific reports*, 8:4522
111. Wood, A. J., Savage, D. G., & Antman, K. H. (2002). Imatinib mesylate—a new oral targeted therapy. *New England Journal of Medicine*, 346:683-693
112. Xin, L., Lawson, D. A., & Witte, O. N. (2005). The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:6942-6947
113. Xu, Y., Zhu, X., Hahm, H. S., Wei, W., Hao, E., Hayek, A., & Ding, S. (2010). Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:8129-8134
114. Xue, Y., Smedts, F., Debruyne, F. M., de la Rosette, J. J., & Schalken, J. A. (1998). Identification of intermediate cell types by keratin expression in the developing human prostate. *Prostate*, 34:292-301.
115. Young, S. R., Saar, M., Santos, J., Nguyen, H. M., Vessella, R. L., & Peehl, D. M. (2013). Establishment and serial passage of cell cultures derived from LuCaP xenografts. *The Prostate*, 73:1251-1262

7 Publikationen

Linxweiler J, Kohn M, Hammer M, Muhs S, Pryalkuhin A, Veith C, Bohle RM, Stöckle M, Junker K, Saar M. Patient-derived, three-dimensional spheroid cultures provide a versatile translational model for the study of organ-confined prostate cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2019, 145(3), 551-559

Saar M, Kohn M, Hasenfus A, Junker K, Stöckle M, Unteregger G. Generation of patient-derived spheroid cultures for in vitro studies in prostate cancer research. *Urologe* 2014; 53[Suppl 1]:9 DOI 10.1007/s00120-014-3603-4.

Linxweiler J, Kohn M, Hasenfus A, Junker K, Stöckle M, Peehl DM, Unteregger G, Saar M. Generation of patient-derived three-dimensional spheroid cultures for in vitro studies on localized prostate cancer. Extended Poster Presentation: 30. Annual EAU Congress (European Association of Urology); 2015 (Madrid (Spain)). *European Urology Supplements* 14.2 (2015)

Hammer M, Linxweiler J, Muhs S, Kohn M, Jung V, Pryalukhin A, Veith C, Junker K, Stöckle M, Saar M. Patient-derived three-dimensional spheroid cultures provide an innovative tool for comprehensive in-vitro studies on organ- confined prostate cancer. 2nd EACR Conference “Goodbye Flat Biology - Models,